

**Universidad de Córdoba**  
**Departamento de Genética**

**EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA AUSENCIA DE  
TIOREDOXINA Y GLUTARREDOXINA EN  
*Escherichia coli***

**Antonio Miranda Vizuite**  
**Tesis Doctoral**  
**Noviembre 1994**

D<sup>a</sup>. CARMEN PUEYO DE LA CUESTA, Dra. en Ciencias Biológicas y Catedrática del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, y D. JUAN LÓPEZ BAREA, Dr. en Ciencias Biológicas y Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba,

INFORMAN:

Que el trabajo “EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA AUSENCIA DE TIORREDOXINA Y GLUTARREDOXINA EN *Escherichia coli*”, realizado bajo nuestra dirección se considera ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, noviembre de 1994



Fdo.: Carmen Pueyo de la Cuesta



Fdo.: Juan López Barea

D<sup>a</sup>. CARMEN PUEYO DE LA CUESTA, Directora del  
Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba,

INFORMA:

Que el trabajo “EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA  
AUSENCIA DE TIORREDOXINA Y GLUTARREDOXINA  
EN *Escherichia coli*”, realizado por D. Antonio Miranda  
Vizuite bajo la dirección de la Profesora Carmen Pueyo de la  
Cuesta del Departamento de Genética y del Profesor Juan  
López Barea del Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular, puede ser presentado para su exposición y defensa  
como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Córdoba, noviembre de 1994

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carmen Pueyo', with a stylized flourish at the end.

Fdo.: Carmen Pueyo de la Cuesta

*A mis padres*  
*A Alicia*  
*Y a la memoria de Yeyu*

*Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda de gran número de personas a las que quiero mostrarles mi más sincero agradecimiento:*

*A Carmen y a Juan, por haberme dado la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación y por su labor en la dirección y corrección de este trabajo.*

*Al Profesor Arne Holmgren por permitirme trabajar en su laboratorio y por intentar en todo momento que mi estancia en Estocolmo fuese lo más fructífera posible.*

*A todos mis compañeros del Departamento de Genética, especialmente a Maite por iniciarme en el trabajo de laboratorio con la “tesina” y sobre todo a Nuria y a Concha por ser muchísimo más que compañeras de trabajo*

*A todos mis compañeros del Departamento de Bioquímica de Veterinaria por los dos estupendos años que pase con ellos “aunque no fuese de allí”. Inestimable ha sido la ayuda de Emilia peleándonos con el ELISA, la de Antonio Rodríguez y Fermin con el HPLC, la de Toño aportando muy buenas ideas en momentos críticos y la de Gabriel por su “Mac-help” e instructivas charlas.*

*A Alicia porque ella fue la artífice de que los meses que pase en Estocolmo fuesen, con mucho, los mejores de mi vida. El dedicarle este trabajo se queda muy corto para compensar toda la ayuda y buenos ratos que allí pasamos.*

*A todos mis compañeros en el Karolinska, muy especialmente a Barbro por cuidarme como si fuera su hijo, por su enorme y constante simpatía y sobre todo por explicarme las cosas en español cuando ya no podía más con el inglés. A Giannis por su interés, sus buenas ideas y las palizas que me daba jugando al billar americano “Ma que pasa, Antonio!!”. A Federico por ser un excelente compañero de*

*trabajo y mejor amigo, y a todos los demás; Fatou, Johanna, Lena(s), Monica, Mikael, Iván...También a Juan Capel (Freak Scene Records) por las inolvidables tertulias de las seis y al resto de amigos allá.*

*A mi familia por su constante apoyo e interés.*

*A todos mis amigos dentro y fuera de la Universidad, sobre todo a Justo (por las cervecitas y las charlas de ciencia), Manolo Sobrino, Juanjo, Mari Carmen, Jesús y Rafa.*

*A Manolito, Fernando, Juano, Juan Clemente y José Ángel, “FLOW” porque juntos hemos escrito un pequeño renglón en el panorama “independiente”.*

*Y a Araceli porque todavía no me explico como ha sido capaz de aguantarme durante todo este último año.*

*A todos.*

# **EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA AUSENCIA DE TIORREDOXINA Y GLUTARREDOXINA EN *Escherichia coli***

**Trabajo realizado en los Departamentos de Genética y de Bioquímica  
y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, para optar al  
grado de Doctor en Ciencias por el licenciado**



**Antonio Miranda Vizuite**

**Córdoba, noviembre de 1994**

**Directores:**



**Dra. Carmen Pueyo de la Cuesta  
Catedrática del Departamento de Genética de la Universidad de  
Córdoba.**



**Dr. Juan López Barea  
Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular de la Universidad de Córdoba.**

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE MATERIAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	ix

**I. INTRODUCCIÓN.....1**

**I.1. TIORREDOXINA.....1**

I.1.1. Tiorredoxina de <i>Escherichia coli</i> .....	2
<i>Estructura de la tiorredoxina</i> .....	2
<i>Localización intracelular</i> .....	4
<i>Funciones de la tiorredoxina</i> .....	5
<i>Donadora de hidrógeno</i> .....	5
<i>Reducción de ribonucleótidos</i> .....	5
<i>Reducción de sulfato</i> .....	6
<i>Reducción de metionina sulfóxido</i> .....	6
<i>Tiorredoxina en el ciclo de vida de fagos</i> .....	7
<i>ADN polimerasa del fago T7</i> .....	7
<i>Ensamblaje de los fagos filamentosos fl y M13</i> .....	8
<i>El gen de la tiorredoxina</i> .....	8
I.1.2. Papel regulador de la tiorredoxina en plantas.....	9
I.1.3. La tiorredoxina del fago T4 .....	11

**I.2. GLUTARREDOXINA.....13**

I.2.1. Glutarredoxina de <i>E. coli</i> .....	13
<i>Estructura y localización intracelular de la glutarredoxina</i> .....	13
<i>Funciones de la glutarredoxina</i> .....	14
<i>El gen de la glutarredoxina</i> .....	15
I.2.2. Glutarredoxina en otros procariotas .....	16

**I.3. CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS DE LA DEFICIENCIA  
EN Trx, TRasa y/o Grx .....18**

**I.4. RIBONUCLEÓTIDO REDUCTASA .....19**

I.4.1. Ribonucleótido reductasas de <i>Escherichia coli</i> .....	20
<i>Aspectos estructurales</i> .....	20
<i>Mecanismo de acción</i> .....	22



	<i>Regulación de la actividad enzimática</i> .....	24
	<i>Regulación a nivel de síntesis</i> .....	25
I.4.2.	Otras ribonucleótido reductasas aeróbicas .....	28
I.4.3.	Ribonucleótido reductasa anaeróbica de <i>E. coli</i> .....	29
	<i>Aspectos estructurales y mecanismo de acción</i> .....	29
	<i>Regulación de la actividad enzimática</i> .....	30
<b>I.5.</b>	<b>GLUTATIÓN</b> .....	31
<b>I.6.</b>	<b>ÁCIDO LIPOICO</b> .....	36
<b>I.7.</b>	<b>REACCIONES DE INTERCAMBIO TIOL/DISULFURO</b> .....	39
I.7.1.	Papel fisiológico del intercambio tiol/disulfuro .....	40
I.7.2.	Enzimología del intercambio tiol/disulfuro .....	40
	<i>Tiorredoxina y glutarredoxina como tioltransferasas</i> .....	41
<b>I.8.</b>	<b>ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS</b> .....	44
I.8.1.	Ensayo de resistencia a la L-arabinosa .....	44
<b>I.9.</b>	<b>EL SISTEMA SOS Y EL PLÁSMIDO pKM101</b> .....	47
I.9.1.	El sistema SOS .....	47
I.9.2.	Mutagénesis asociada al sistema SOS.....	47
I.9.3.	El plásmido pKM101 .....	48
<b>I.10.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	49
<b>II.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	50
<b>II.1.</b>	<b>COMPUESTOS QUÍMICOS</b> .....	50
<b>II.2.</b>	<b>ESTIRPES BACTERIANAS</b> .....	51
II.2.1.	Características genéticas .....	51
II.2.2.	Conservación de las estirpes .....	53
II.2.3.	Crecimiento de las bacterias .....	54
	<i>Ensayos de mutagénesis</i> .....	54
	<i>Ensayos bioquímicos</i> .....	54
	<i>Curvas de crecimiento</i> .....	54
II.2.4.	Comprobación del fenotipo de las estirpes .....	54

---

<b>II.3. PROTOCOLOS</b>	56
II.3.1. Eliminación del plásmido pKM101	56
II.3.2. Ensayos de mutagénesis	56
<i>Ensayos en cajas selectivas</i>	56
<i>Ensayos con preincubación</i>	57
<i>Mutagénesis con luz UV</i>	57
II.3.3. Transferencia de genes mediante transducción con el fago P1 <sub>vir</sub>	57
<i>Preparación de lisados y titulación</i>	57
<i>Transducción con el fago P1<sub>vir</sub></i>	58
II.3.4. Transferencia de plásmidos por transformación	58
<i>Aislamiento de plásmidos</i>	58
<i>Preparación de bacterias competentes</i>	59
<i>Transformación con ADN de plásmido</i>	59
II.3.5. Actividades enzimáticas	59
<i>Obtención de extractos libres de células</i>	59
<i>Actividad ribonucleótido reductasa</i>	60
<i>Actividad glutarredoxina</i>	60
<i>Actividad tiorredoxina</i>	61
<i>Actividad tiorredoxina reductasa</i>	61
<i>Actividad glutatión reductasa</i>	61
II.3.6. Inmunoensayos	62
<i>Preparación y purificación de los anticuerpos</i>	62
<i>Titulación de los anticuerpos anti-Tiorredoxina</i>	63
<i>Titulación de los anticuerpos anti-Glutarredoxina</i>	63
<i>Determinación de tiorredoxina y glutarredoxina por inmuno-ensayo</i>	65
II.3.7. Detección electroquímica de glutatión oxidado, reducido y disulfuros mixtos	66
<i>Obtención de los extrcatos</i>	66
<i>Determinación de glutatión oxidado, reducido y disulfuros mixtos</i>	67
II.3.8. Determinación de proteína	68
<b>II.4. SOLUCIONES Y MEDIOS</b>	69
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	84
<b>III.1. MUTANTES NULOS EN TIORREDOXINA Y/O GLUTARREDOXINA</b>	84
III.1.1. Construcción de la estirpe UC518 portadora de la mutación $\Delta trxA$	84

III.1.2.	Construcción de la estirpe UC525 portadora de la mutación <i>grx::kan</i> ..	86
III.1.3.	Construcción de las estirpes UC646 y UC647 portadoras de las mutaciones <i>grx::kan ΔtrxA</i> .....	86
III.1.4.	Crecimiento de las estirpes derivadas de UC1101 en distintos tipos de medio .....	88
	<i>Crecimiento en cajas</i> .....	89
	<i>Crecimiento en medio líquido</i> .....	89
	<i>Crecimiento en cajas de medio mínimo selectivo</i> .....	91
III.1.5.	Respuesta mutagénica de las estirpes derivadas de UC1101 .....	92
	<i>Frecuencia de mutación espontánea</i> .....	92
	<i>Respuesta mutagénica a agentes genotóxicos</i> .....	94
III.1.6.	Caracterización bioquímica de las estirpes derivadas de UC1101 .....	100
	<i>Niveles de tiorredoxina y glutarredoxina</i> .....	100
	<i>Capacidad de reducción de ribonucleótidos</i> .....	103
	<i>Actividad ribonucleótido reductasa</i> .....	105
	<i>Contenido en glutatión</i> .....	108
 <b>III.2. ESTIRPES SOBREPDUCTORAS DE TIORREDOXINA, GLUTARREDOXINA Y RIBONUCLEÓTIDO REDUCTASA</b> .....		110
III.2.1.	Caracterización bioquímica de las estirpes sobreproductoras .....	110
	<i>Niveles de tiorredoxina y glutarredoxina</i> .....	110
	<i>Actividad ribonucleótido reductasa y contenido en glutatión</i> ...	115
 <b>III.3. MUTANTES NULOS EN GLUTATIÓN Y/O ÁCIDO LIPOICO</b> .....		118
III.3.1.	Construcción de la estirpe UC858 portadora de la mutación <i>gshA::Tn10kan</i> .....	118
III.3.2.	Construcción de la estirpe UC859 portadora de las mutaciones <i>gshA::Tn10kan ΔtrxA</i> .....	118
III.3.3.	Construcción de la estirpe UC952 portadora de las mutaciones <i>grx::kan gshA::Tn10kan</i> .....	120
III.3.4.	Construcción de la estirpe UC956 portadora de las mutaciones <i>grx::kan gshA::Tn10kan ΔtrxA</i> .....	120
III.3.5.	Construcción de la estirpe UC938 portadora de la mutación <i>lipA2</i> .....	121
III.3.6.	Construcción de las estirpes UC939 y UC941 portadoras de las mutaciones <i>lipA2 ΔtrxA</i> y <i>lipA2 grx::kan</i> .....	123
III.3.7.	Construcción de la estirpe UC954 portadora de las mutaciones <i>lipA2 gshA::Tn10kan ΔtrxA</i> .....	124
III.3.8.	Caracterización bioquímica de las estirpes deficientes en glutatión y/o ácido lipoico .....	124
	<i>Niveles de tiorredoxina y glutarredoxina</i> .....	124

<i>Actividad RDRasa y contenido en glutatión en las estirpes deficientes en glutatión y ácido lipoico .....</i>	<i>127</i>
---	------------

### **III.4. ESTADO REDOX DEL GLUTATIÓN ..... 130**

III.4.1. Estado redox del glutatión en las estirpes deficientes en tiorredoxina y/o glutarredoxina derivadas de UC1101 y K38 .....	130
III.4.2. Estado redox del glutatión en las estirpes sobreproductoras derivadas del tipo silvestre UC5710 .....	132
III.4.3. Estado redox del glutatión en las estirpes deficientes en glutatión y/o ácido lipoico.....	134

### **III.5. ACTIVIDAD TIORREDOXINA REDUCTASA Y GLUTATIÓN REDUCTASA ..... 136**

## **IV. CONCLUSIONES..... 139**

## **V. BIBLIOGRAFÍA..... 140**

ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Estructura de la tiorredoxina de <i>E. coli</i> .....	3
<b>Figura 2:</b>	Reacción catalizada por la ribonucleótido reductasa de <i>E. coli</i> .....	5
<b>Figura 3:</b>	Ruta de asimilación del sulfato inorgánico en <i>E. coli</i> .....	7
<b>Figura 4:</b>	Esquema de la ruta ferredoxina-tiorredoxina en plantas .....	10
<b>Figura 5:</b>	Estructura de la ribonucleótido reductasa de <i>E. coli</i> .....	21
<b>Figura 6:</b>	Mecanismo de reacción de la RDRasa de <i>E. coli</i> .....	23
<b>Figura 7:</b>	Cisteínas de la subunidad R1 de la RDRasa de <i>E. coli</i> implicadas en el proceso de reducción de ribonucleótidos .....	24
<b>Figura 8:</b>	Estructura del glutatión reducido .....	31
<b>Figura 9:</b>	Esquema de la biosíntesis de glutatión reducido .....	33
<b>Figura 10:</b>	Estructura del ácido lipoico .....	36
<b>Figura 11:</b>	Mecanismo de acción de la tiorredoxina en la reducción de disulfuros proteínicos .....	42
<b>Figura 12:</b>	Operón <i>araBAD</i> con los sitios de control y el gen regulador <i>araC</i> .....	45
<b>Figura 13:</b>	Purificación por inmunoadinidad de los anticuerpos anti-Trx y anti-Grx.....	63
<b>Figura 14:</b>	Titulación de los anticuerpos anti-Trx purificados por inmunoadinidad .....	64
<b>Figura 15:</b>	Titulación de los anticuerpos anti-Grx purificados por inmunoadinidad.....	65
<b>Figura 16:</b>	Construcción de estirpes de <i>E. coli</i> derivadas de UC1101 deficientes en tiorredoxina y/o glutarredoxina.....	85
<b>Figura 17:</b>	Supervivencia y mutantes Ara <sup>r</sup> inducidos por MNNG en las estirpes de <i>E. coli</i> derivadas de UC1101 .....	98
<b>Figura 18:</b>	Determinación por ELISA de tiorredoxina (A) y glutarredoxina (B) en extractos libres de células de <i>E. coli</i> derivadas de UC1101 .....	102
<b>Figura 19:</b>	Construcción de las estirpes de <i>E. coli</i> deficientes en glutatión.....	119
<b>Figura 20:</b>	Construcción de estirpes de <i>E. coli</i> deficientes en ácido lipoico .....	122

ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b>	Compuestos mutagénicos ensayados .....	50
<b>Tabla 2:</b>	Estirpes bacterianas patrones .....	51
<b>Tabla 3:</b>	Estirpes bacterianas aisladas en el presente trabajo .....	52
<b>Tabla 4:</b>	Plásmidos .....	53
<b>Tabla 5:</b>	Eficiencia de la transducción de las mutaciones <i>grx::kan</i> y <i>zbi::Tn10</i> en distintas estirpes receptoras y frecuencia de cotransducción $Tc^r$ $Kn^r$ .....	87
<b>Tabla 6:</b>	Efecto de la adición de metionina o cistina sobre el crecimiento en cajas de medio mínimo de las estirpes derivadas de UC1101 .....	89
<b>Tabla 7:</b>	Tiempo de generación en medio líquido de las estirpes derivadas de UC1101 .....	90
<b>Tabla 8:</b>	Efecto de la adición de metionina o cistina sobre el crecimiento en cajas de medio mínimo selectivo de los mutantes $Ara^r$ procedentes de las estirpes derivadas de UC1101 .....	93
<b>Tabla 9:</b>	Tasa de mutantes espontáneos $Ara^r$ en cajas de medio mínimo selectivo suplementado con cistina de las estirpes derivadas de UC1101 .....	94
<b>Tabla 10:</b>	Respuesta mutagénica a MNNG en cajas de medio mínimo selectivo suplementado con cistina o metionina de las estirpes derivadas de UC1101 .....	96
<b>Tabla 11:</b>	Comparación de la respuesta mutagénica de las estirpes UC646 y UC647 .....	97
<b>Tabla 12:</b>	Respuesta mutagénica de las estirpes derivadas de UC1101 .....	99
<b>Tabla 13:</b>	Potencia mutagénica de distintos agentes en las estirpes derivadas de UC1101 ...	100
<b>Tabla 14:</b>	Niveles de tiorredoxina y glutarredoxina de las estirpes derivadas de UC1101 ...	101
<b>Tabla 15:</b>	Capacidad de reducción de ribonucleótidos en extractos libres de células de las estirpes derivadas de UC1101 .....	104
<b>Tabla 16:</b>	Actividad ribonucleótido reductasa y contenido en glutatión de diversas estirpes de <i>E. coli</i> .....	106
<b>Tabla 17:</b>	Efecto de la sobreproducción de Trx, Grx y RDRasa sobre los niveles de tiorredoxina y glutarredoxina del tipo silvestre UC5710 .....	111
<b>Tabla 18:</b>	Efecto de la sobreproducción de Trx, Grx y RDRasa sobre los niveles de tiorredoxina y glutarredoxina del mutante doble UC827 ( <i>grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup></i> ) .....	113
<b>Tabla 19:</b>	Efecto de la adición de anticuerpos anti-tiorredoxina sobre la actividad glutarredoxina de distintas estirpes derivadas de UC1101 .....	115
<b>Tabla 20:</b>	Efecto de la sobreproducción de Trx, Grx y RDRasa sobre la actividad RDRasa y contenido en glutatión del tipo silvestre UC5710 y del mutante doble UC827 ( <i>grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup></i> ) .....	116
<b>Tabla 21:</b>	Niveles de tiorredoxina y glutarredoxina en estirpes deficientes en glutatión y/o ácido lipoico derivadas de UC5710 .....	126

<b>Tabla 22:</b>	Actividad ribonucleótido reductasa y contenido en glutatión de estirpes deficientes en glutatión y/o ácido lipoico derivadas de UC5710 .....	128
<b>Tabla 23:</b>	Estado redox del glutatión en diversas estirpes de <i>E. coli</i> .....	131
<b>Tabla 24:</b>	Efecto de la sobreproducción de Trx, Grx y RDRasa sobre el estado redox del glutatión del tipo silvestre UC5710 .....	133
<b>Tabla 25:</b>	Estado redox del glutatión en estirpes deficientes en glutatión y/o ácido lipoico derivadas de UC5710 .....	135
<b>Tabla 26:</b>	Actividad tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa en estirpes derivadas de UC1101 .....	137
<b>Tabla 27:</b>	Actividad tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa en estirpes deficientes en glutatión y/o ácido lipoico derivadas de UC5710.....	137
<b>Tabla 28:</b>	Efecto de la sobreproducción de Trx, Grx y RDRasa sobre la actividad tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa del tipo silvestre UC5710 y del mutante doble UC827 ( <i>grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup></i> ) .....	138

## ABREVIATURAS

AMPc.....	Adenosina 5'-monofosfato cíclico
APS.....	Adenosina 5'-fosfosulfato
ATP.....	Adenosina 5'-trifosfato
BSA.....	Seroalbúmina bovina
CAP.....	Proteína activadora de genes catabólicos
CDP.....	Citidina 5'-difosfato
CMP.....	Citidina 5'-monofosfato
DBE.....	1,2-Dibromoetano
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
DO.....	Densidad óptica
DTNB.....	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
DTT.....	DL-ditiotreitol
EDTA.....	Ácido etilendiamino-tetracético
EMS.....	Etil metanosulfonato
EPR.....	Resonancia paramagnética electrónica
FBPasa.....	Fructosa 1,6-bifosfatasa
Grx.....	Glutarredoxina
GRasa.....	Glutación reductasa
GSH.....	Glutación reducido
GSSG.....	Glutación oxidado
HED.....	2-bis-(hidroxietil)-disulfuro
HEPES.....	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HPLC.....	Cromatografía líquida de alta presión
LB.....	Luria-Bertani
MNNG.....	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
MOPS.....	Ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico
NADP(H).....	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
4NQO.....	4-Nitroquinolina-N-óxido
OPD.....	o-fenilendiamina
PAPS.....	Adenosina 3'-fosfato 5'-fosfosulfato
PDI.....	Proteína disulfuro isomerasa
PFU.....	Unidades formadoras de halos
rpm.....	Revoluciones por minuto
RDRasa.....	Ribonucleótido reductasa
<i>t</i> -butil-OOH.....	Hidroperóxido de terbutilo
TRasa.....	Tiorredoxina reductasa
Trx.....	Tiorredoxina
VB.....	Vogel-Bonner



## ***I. INTRODUCCIÓN***

## 1.1. TIORREDOXINA

La tiorredoxina es una proteína pequeña, ubicua y con un sitio activo redox que posee dos residuos de cisteína (Cys-Gly-Pro-Cys). La proteína puede existir tanto en forma reducida o ditiólica  $\text{Trx}(\text{SH})_2$ , como en forma oxidada  $\text{Trx-S}_2$  cuando los residuos de cisteína forman un puente disulfuro intramolecular (Holmgren, 1985). La tiorredoxina participa en reacciones redox catalizadas mediante la oxidación reversible de su sitio activo entre sus estados ditiólico y disulfuro. La tiorredoxina oxidada es reducida por el NADPH y una flavoproteína denominada tiorredoxina reductasa (Moore *et al.*, 1964). Por otro lado, la forma reducida de la tiorredoxina es una poderosa proteína disulfuro oxidorreductasa.

La tiorredoxina está presente en todos los organismos, tanto procarióticos como eucarióticos. Virus, bacterias, levaduras, plantas y células animales contienen tiorredoxinas, con un peso molecular  $\sim 12.000$  daltons, que han evolucionado de un antecesor común (Holmgren, 1985). La tiorredoxina fue descrita por primera vez en levaduras, como donador de electrones en la reducción de metionina sulfóxido (Black *et al.*, 1960; Wilson *et al.*, 1961). Posteriormente se aisló y caracterizó como donadora de electrones de la ribonucleótido reductasa de *E. coli* (Laurent *et al.*, 1964). Más tarde se descubrió que también actuaba como donadora de electrones de la PAPS reductasa, enzima que participa en la reducción asimilatoria de sulfato en levaduras (González-Porqué *et al.*, 1970) y *E. coli* (Tsang y Schiff, 1976), y de la metionina sulfóxido reductasa en bacterias, levaduras, plantas, algas y mamíferos (Holmgren, 1985). Recientemente se ha identificado en *Drosophila melanogaster* una proteína homóloga a la tiorredoxina que se requiere en la meiosis y el desarrollo temprano de este organismo (Salz *et al.*, 1994).

La tiorredoxina juega un papel esencial en los ciclos de vida y relaciones hospedador-virus de varios bacteriófagos. Así, la tiorredoxina de *E. coli* se necesita en el ensamblaje de ciertos fagos filamentosos, como f1 y M13 (Russel y Model, 1985a). Por otra parte, la tiorredoxina de *E. coli* es una de las subunidades de la ADN-polimerasa codificada por el fago T7 (Adler y Modrich, 1983).

En cloroplastos de plantas, se han identificados dos formas de tiorredoxina, denominadas *f* y *m*, que regulan la actividad de enzimas fotosintéticas como

fructosa 1,6-bifosfatasa y malato deshidrogenasa. Este proceso requiere la reducción de tiorredoxina por la ferredoxina, a través de la ferredoxina-tiorredoxina reductasa presente en células fotosintéticas (Holmgren 1985).

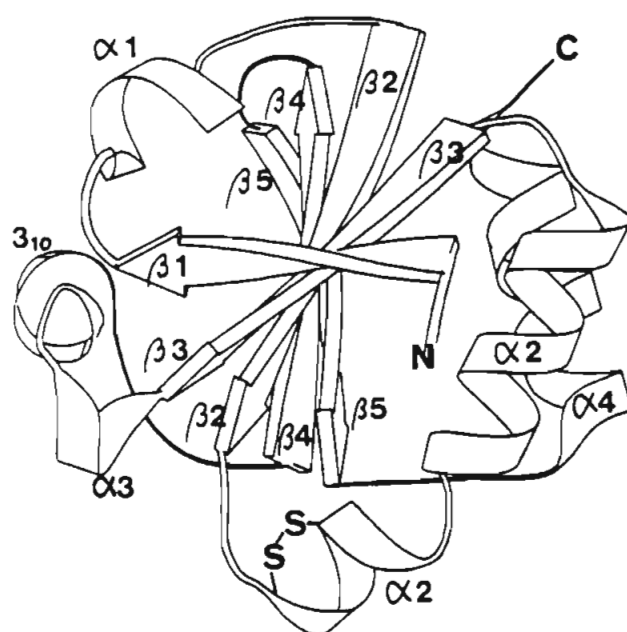
En mamíferos, se ha encontrado un factor idéntico a la tiorredoxina en células adultas T con actividad estimuladora del crecimiento e inductora del receptor de la interleucina 2 (Tagaya *et al.*, 1989). La tiorredoxina también se ha identificado como un factor estimulador de la actividad citotóxica eosinófila en monocitos (Silberstein *et al.*, 1989), como activador endógeno del receptor de glucocorticoides de rata (Grippio *et al.*, 1983; 1985), como regulador de la CMP kinasa, etc. (Holmgren, 1985; 1989).

### 1.1.1. Tiorredoxina de *Escherichia coli*

#### *Estructura de la tiorredoxina*

La secuencia de aminoácidos de la tiorredoxina de *E. coli* ha sido determinada tanto por la secuenciación de la proteína (Holmgren, 1968) como por secuenciación del gen que la codifica (Wallace y Kushner, 1984; Höög *et al.*, 1984; Lim *et al.*, 1985). La proteína, de 108 aminoácidos, tiene un peso molecular de 11.700 daltons. Los residuos del centro activo, Cys-32 y Cys-35, forman un puente disulfuro en la forma oxidada de la proteína. Muchos de los residuos ácidos están localizados en el tercio aminoterminal, mientras que los dos tercios carboxiterminales contienen la mayoría de los residuos hidrofóbicos (Holmgren, 1985).

La estructura de la forma oxidada se ha determinado por cristalografía de rayos X con una resolución de 1,7 Å (Katti *et al.*, 1990) (Figura 1). La proteína tiene aproximadamente el 75% de sus residuos organizados en estructura secundaria  $\alpha$ -hélice o hoja plegada  $\beta$ , lo cual le confiere una alta estabilidad. La molécula tiene un cuerpo central de cinco hojas plegadas  $\beta$  ( $\beta_1$ - $\beta_5$ ) rodeadas por cuatro hélices  $\alpha$  ( $\alpha_1$ - $\alpha_4$ ). Los dos residuos de cisteína Cys-32 y Cys-35 que constituyen el centro activo se encuentran expuestos en una protuberancia de la molécula al final de la hoja plegada  $\beta_2$ , siendo ésta la primera proteína en la que se describió que el centro activo se encontraba en una protuberancia y no en una concavidad (Holmgren, 1985). Estos residuos son accesibles sólo desde un lado de



**Figura 1. Estructura de la tiorredoxina de *E. coli*.** Las cuatro hojas plegadas  $\beta$  se muestran como flechas y constituyen el cuerpo interno de la proteína. Las cuatro  $\alpha$ -hélices y la  $3_{10}$  rodean este cuerpo central. El puente disulfuro está localizado tras la hoja  $\beta_2$  y constituye la porción N-terminal de la hélice  $\alpha_3$ . Los extremos amino- y carboxi-terminal se indican como N y C respectivamente

la estructura que presenta una superficie plana constituida por numerosos residuos sugiriendo que esta superficie podría estar implicada en la unión de la tiorredoxina con otras proteínas durante las reacciones redox (Eklund *et al.*, 1984). Los residuos que constituyen esta superficie están conservados en otras tiorredoxinas de procariontes (Gleason y Holmgren, 1988).

La estructura de la tiorredoxina reducida aún no ha sido definida en detalle, pues no se han obtenido cristales de esta forma. Cuando se reduce la tiorredoxina tienen lugar cambios conformacionales localizados, como demuestran los datos espectrofotométricos (Reutimann *et al.*, 1981). Mediante técnicas de resonancia magnética nuclear se ha determinado la estructura en solución de la tiorredoxina reducida, detectándose sólo cambios conformacionales limitados con respecto de la forma oxidada. Los cambios principales se han localizado en residuos que forman parte de la hoja plegada  $\beta_2$  y preceden al centro activo, el propio centro activo y en ciertos residuos que constituyen la superficie hidrofóbica descrita anteriormente (LeMaster y Richards, 1988; Dyson *et al.*, 1988; 1989; 1990).

La secuencia de aminoácidos de la tiorredoxina de *E. coli* muestra alrededor de un 50% de identidad con la de otras tiorredoxinas bacterianas. Los residuos conservados se localizan en zonas de las proteínas que sugirieren estructuras terciarias similares, lo cual es esencial para el mantenimiento de la actividad redox. Aparte del sitio activo, todas las tiorredoxinas tienen secuencias idénticas en los residuos del 23 al 29 y del 76 al 82, que forman en *E. coli* las hojas plegadas  $\beta_2$  y  $\beta_4$ , respectivamente. En la tiorredoxina de *E. coli* estas dos hojas están enfrentadas en toda su longitud y posiblemente su interacción estabiliza la estructura y mantiene la protuberancia del sitio activo. Otros residuos conservados, que abarcan del 51 al 58 y del 91 al 93, han sido implicados en las interacciones tiorredoxina-proteína (Eklund *et al.*, 1984; Gleason y Holmgren, 1988).

### *Localización intracelular*

*E. coli* posee de 10.000 a 20.000 moléculas de tiorredoxina por célula (Holmgren *et al.*, 1978; Holmgren, 1983). Mediante lisis suave y centrifugación se ha demostrado que la tiorredoxina está en la fracción soluble. Sin embargo, estudios citoquímicos han identificado a la tiorredoxina en asociación con la membrana (Holmgren *et al.*, 1978; Nygren *et al.*, 1981). La tiorredoxina se libera de las bacterias mediante choque osmótico pero es retenida en esferoplastos (Lunn y Pigiet, 1982), indicando que la proteína se encuentra en el espacio periplásmico o se asocia a la membrana externa. Mediante técnicas inmunocitoquímicas la tiorredoxina ha sido identificada tanto en la membrana celular como en la región del nucleoide. Estudios similares con agentes productores de enlaces cruzados sugieren una localización más precisa en la membrana interna y en los sitios de adhesión donde membrana interna y externa son contiguos (Nygren *et al.*, 1981; Bayer *et al.*, 1987). Esta localización explicaría el papel de la tiorredoxina en el ensamblaje de fagos filamentosos y la formación de puentes disulfuro en proteínas que se exportarían al espacio periplásmico. La tiorredoxina soluble o asociada al nucleoide podría estar involucrada en la síntesis de desoxirribonucleótidos, aunque la localización de la ribonucleótido reductasa en *E. coli* aún no ha sido determinada.

## Funciones de la tiorredoxina

### Donadora de hidrógeno

La forma oxidada de la tiorredoxina  $\text{Trx-S}_2$  es reducida por el NADPH y la flavoproteína tiorredoxina reductasa para dar  $\text{Trx-(SH)}_2$  según la siguiente reacción:



La forma reducida actúa entonces como donadora de hidrógeno de enzimas reductoras como la ribonucleótido reductasa, PAPS reductasa y metionina sulfóxido reductasa. La tiorredoxina, por tanto, participa en un sistema cíclico de oxidorreducción en el que transfiere equivalentes de poder reductor desde el NADPH hasta enzimas específicas.

### Reducción de ribonucleótidos.

La ribonucleótido reductasa es una enzima esencial en *E. coli* por ser responsable de la conversión de ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos, reacción que se muestra en la Figura 2. La enzima requiere ditiol como donadores de electrones. La tiorredoxina muestra una  $K_m$  por la ribonucleótido reductasa de  $1.3 \mu\text{M}$ . No obstante existen evidencias en contra de un papel general de la tiorredoxina como donador de hidrógeno para la RDRasa, tal es el caso de la tiorredoxina de *Corynebacterium nephridii* y médula de hueso de conejo (Meng y Hogenkamp, 1981; Hopper e Iurlano, 1983).

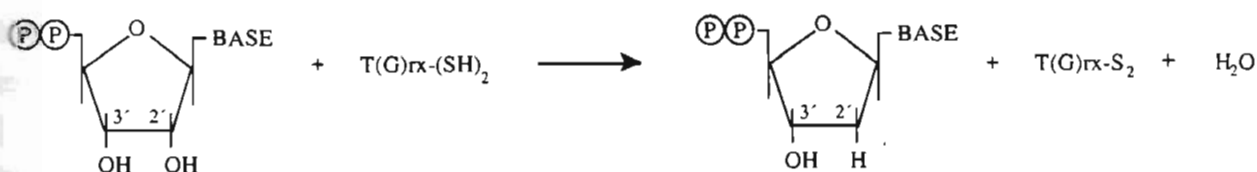


Figura 2. Reacción catalizada por la ribonucleótido reductasa de *E. coli*.

### *Reducción de sulfato*

Cuando *E. coli* crece en medio mínimo incorpora sulfato del medio y tras una serie de pasos enzimáticos forma cisteína, que actúa como precursora de otros compuestos con azufre reducido, tales como metionina, coenzima A o glutatión (Kredich, 1987). La Figura 3 muestra un esquema de la ruta biosintética de la cisteína. Uno de los pasos clave en esta ruta es la conversión de PAPS (3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato) en sulfito, proceso catalizado por la enzima PAPS reductasa (codificada por el gen *cysH*). Esta enzima requiere un donador de electrones, pudiendo actuar como tales tanto la tiorredoxina como la glutarredoxina (Tsang y Schiff, 1976; Tsang, 1981).

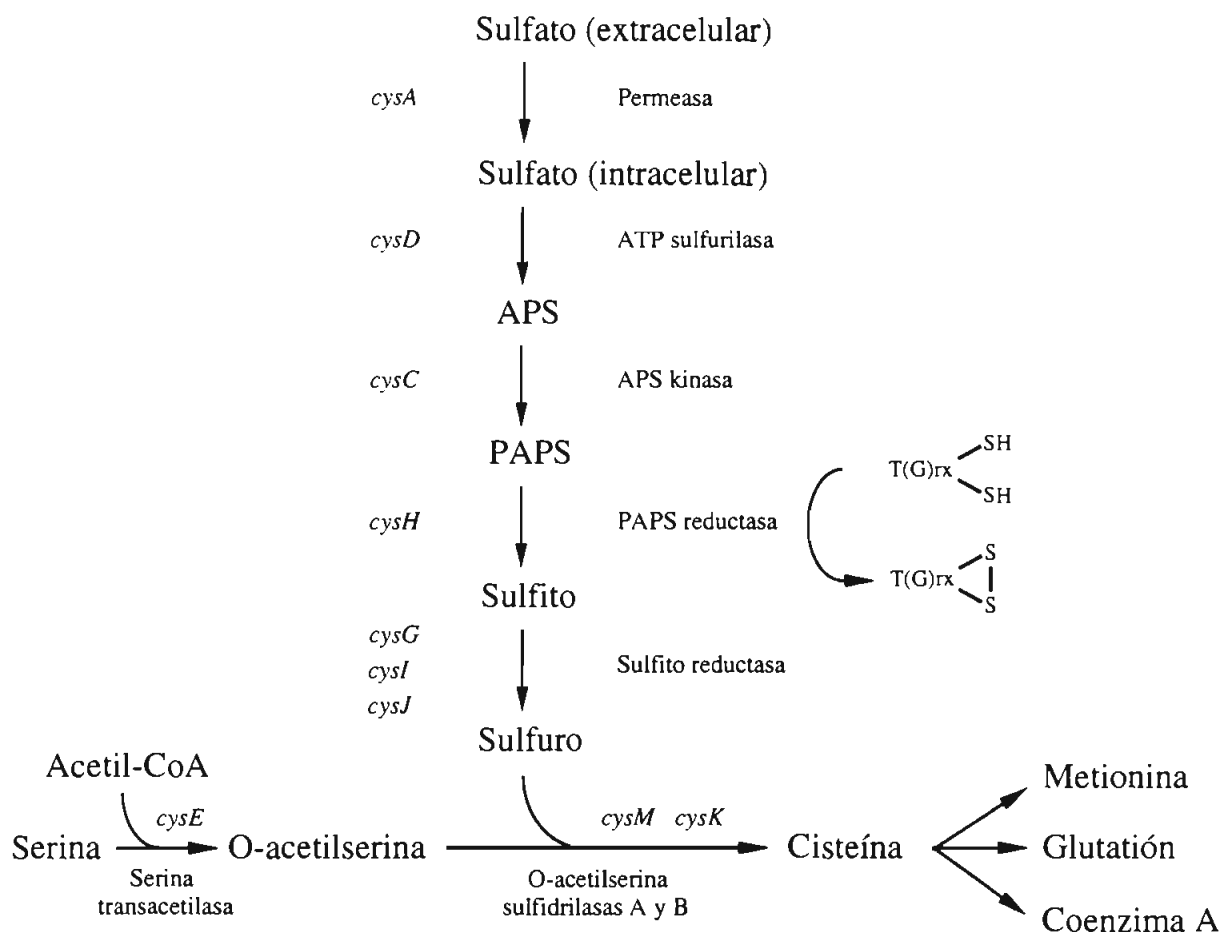
La enzima APS kinasa, responsable de la síntesis de PAPS, es activada por tiorredoxina reducida, pero inactivada por glutatión oxidado. Esto podría reflejar una coordinación celular entre la activación del sulfato y su reducción (Schriek y Schwenn, 1986).

### *Reducción de metionina sulfóxido*

Las sulfóxido reductasas son enzimas que catalizan la reducción de un sulfóxido por NADPH, según el esquema general de la siguiente reacción:



La primera enzima de este grupo que se aisló fue la metionina sulfóxido reductasa de levadura. Junto a ésta se aislaron otras dos fracciones proteínicas, esenciales para su actividad, que resultaron ser la tiorredoxina y tiorredoxina reductasa (González-Porqué *et al.*, 1970a; b). Lo mismo ocurre en *E. coli* (Ejiri *et al.*, 1979; 1980). En la reducción de ribonucleótidos y sulfato los sistemas tiorredoxina y glutarredoxina son intercambiables como donadores de electrones; sin embargo, sólo la tiorredoxina actúa como donadora en la reducción de la metionina sulfóxido (Russel y Model, 1986). Otra enzima diferente de *E. coli* que reduce residuos de metionina sulfóxido unido a proteínas, también depende de tiorredoxina (Brot *et al.*, 1981). En células de mamífero se ha demostrado que estas enzimas están implicadas en la reparación de proteínas dañadas por agentes oxidantes (Holmgren, 1985).



**Figura 3. Ruta de asimilación del sulfato inorgánico en *E. coli***

### ***Tiorredoxina en el ciclo de vida de fagos***

La infección de *E. coli* por bacteriófagos como T4, T7, f1 o M13 es el resultado de una interacción virus-hospedador que implica a la tiorredoxina, aunque en distintas fases del ciclo de vida según el virus del que se trate (Holmgren, 1985).

### ***ADN polimerasa del fago T7***

El fago T7 contiene una molécula de ADN linear de doble cadena con 39.936 pares de bases de secuencia conocida (Dunn y Studier, 1983). Mutantes de *E. coli* que no permiten el crecimiento del fago fueron aislados por Chamberlin (1974). Dichos mutantes no permitían la replicación del ADN fágico al carecer de



actividad ADN polimerasa (Modrich y Richardson, 1975a; b). Extractos de *E. coli* silvestre restauraban la actividad gracias a una proteína estable de 12.000 daltons. La posterior purificación de la ADN polimerasa de T7 demostró que ésta estaba constituida por el producto del gen fágico 5 (80.000 daltons) y otra proteína codificada por el hospedador, en una estequiometría 1:1. Esta proteína resultó ser la tiorredoxina (Modrich y Richardson, 1975a; Mark y Richardson, 1976). La tiorredoxina forma un complejo estable con el producto del gen 5 del fago y se puede aislar como tal (Gleason y Holmgren, 1988). El producto del gen 5 tiene una baja actividad 5'-3'ADN polimerasa y 3'-5'exonucleasa de doble cadena, aunque presenta una alta actividad 3'-5'exonucleasa de cadena sencilla. La adición de tiorredoxina junto con la proteína codificada por el gen 5 del fago reconstituye *in vitro* el complejo, resultando una ADN polimerasa altamente eficiente ( $K_{cat}$  superior a 250 nucleótidos por segundo) con actividad 3'-5'exonucleasa de doble cadena. Aunque únicamente la tiorredoxina en su forma reducida activa el producto del gen 5 se sabe que no es necesario un ciclo redox ya que la enzima es activa en ausencia de agentes reductores (Adler y Moldrich, 1983; Huber *et al.*, 1986).

### *Ensamblaje de los fagos filamentosos f1 y M13*

Los bacteriófagos f1 y M13 son virus filamentosos específicos de bacterias machos F<sup>+</sup> y Hfr. Los virus maduros se liberan de la célula por extrusión a través de la membrana mientras que la bacteria sigue creciendo y dividiéndose (Denhardt, 1975). La tiorredoxina reducida se requiere en el ensamblaje de estos fagos filamentosos, proceso que tiene lugar en la membrana de la célula (Gleason y Holmgren, 1988). Sin embargo, la tiorredoxina no parece intervenir mediante un ciclo catalítico redox, pues mutantes de tiorredoxina con las dos cisteínas del sitio activo cambiadas por residuos de serina son totalmente activas en el ensamblaje, lo que sugiere que la conformación reducida de la tiorredoxina es lo que se requiere un ensamblaje eficiente (Russel y Model, 1986).

### *El gen de la tiorredoxina*

La caracterización de mutantes en el gen de la tiorredoxina de *E. coli* y proteínas relacionadas ha esclarecido muchas de las funciones de esta proteína. El gen ha sido clonado y secuenciado, se localiza en el minuto 84,7 del cromosoma, justo antes del gen *rho* que codifica el factor de terminación de la transcripción.

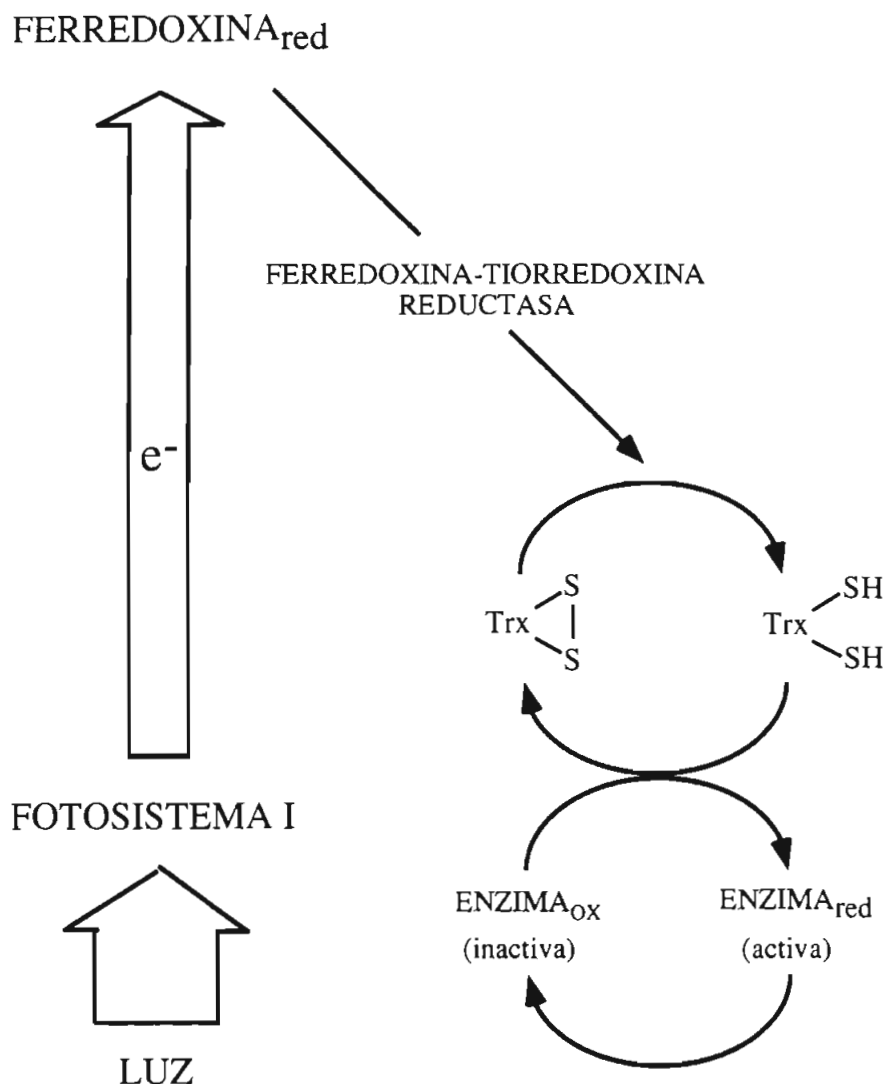
Los mutantes *trxA<sup>-</sup>* no presentan alteraciones en la tasa de crecimiento aunque tienen una prolongada fase de latencia, que puede ser suprimida con la adición de cistina (Holmgren *et al.*, 1978).

El gen de la tiorredoxina se transcribe a partir de un único promotor situado 114 nucleótidos antes del codón de iniciación de la traducción (Wallace y Kushner, 1984; Höög *et al.*, 1984; Lim *et al.*, 1985a). Este promotor es una diez veces más débil que el promotor del siguiente gen *rho* (Matsumoto *et al.*, 1986). Adicionalmente, se ha localizado otra posible secuencia promotora 74 nucleótidos antes del codón de iniciación aunque aún no hay evidencia de transcripción a partir del mismo (Lim *et al.*, 1985a; Matsumoto *et al.*, 1986).

### **I.1.2. Papel regulador de la tiorredoxina en plantas**

La luz proporciona la energía para la fotosíntesis en los tejidos verdes de plantas. Esta energía captada por la clorofila se convierte en ATP y NADPH que se usan en la asimilación del CO<sub>2</sub> y síntesis de otros componentes celulares. La luz también tiene importantes funciones reguladoras al controlar la actividad de enzimas específicas del cloroplasto (Buchanan, 1980). Actúa como un interruptor cambiando el metabolismo oxidativo en la oscuridad por un metabolismo fotosintético en presencia de luz. Diferentes mecanismos han sido propuestos para explicar la regulación por la luz. Entre ellos destacan un incremento del pH del estroma (pH 7 a 8), aumento de la concentración de iones Mg<sup>2+</sup> (1-3 mM), cambios en la concentración de los efectores (ATP y NADPH) y activación de determinadas enzimas a través de la tiorredoxina. La regulación de la actividad de enzimas fotosintéticas por tiorredoxina fue descubierta al demostrarse que una pequeña proteína del cloroplasto complementaba una mutación tiorredoxina en células de *E. coli*.

La regulación de la fotosíntesis mediada por tiorredoxina requiere un sistema constituido por la ferredoxina, una ferredoxina/tiorredoxina reductasa y varias tiorredoxinas cloroplásticas (Buchanan, 1980). En presencia de luz los electrones se transfieren desde la clorofila a la ferredoxina y de ahí vía una ferredoxina/tiorredoxina reductasa a la Trx de acuerdo con la reacción que se muestra en la Figura 4. La Trx una vez reducida activa gran cantidad de enzimas entre las que se encuentran enzimas del Ciclo de Calvin (Holmgren, 1985).



**Figura 4. Esquema de la ruta ferredoxina-tiorredoxina en plantas.**

Todos los tejidos vegetales presentan dos tiorredoxinas, a diferencia de los mamíferos en los que sólo se encuentra una. El sistema de tiorredoxina mejor caracterizado en plantas es el de espinaca (Schürmann *et al.*, 1981), donde se han identificado dos tiorredoxinas: el tipo *f* que activa la fructosa-1,6-bifosfatasa (FBPasa) y el tipo *m* que activa la NADP-malato dehidrogenasa. Dichas proteínas presentan distinta composición de aminoácidos aunque comparten un mismo peso molecular de alrededor de 12.000 daltons y un mismo centro activo Cys-Gly-Pro-Cys, que a su vez es el mismo que el de *E. coli*. Sin embargo, la tiorredoxina *m* tiene una mayor homología con la tiorredoxina de *E. coli* que la tiorredoxina *f* (Tsugita, 1983). La regulación de la FBPasa y NADP malato dehidrogenasa por tiorredoxina no está aún bien conocida a nivel molecular, aunque parece ser que está mediada por un mecanismo de intercambio tiol-disulfuro (Buchanan, 1980).

### I.1.3. La tiorredoxina del fago T4

La infección de *E. coli* por el fago T4 provoca la inducción de una ribonucleótido reductasa y una tiorredoxina codificada por el virus. La tiorredoxina de T4, que es reducida por NADPH y la tiorredoxina reductasa del hospedador dona electrones a la ribonucleótido reductasa del virus pero no a la de *E. coli*. Ambas RDRasas son similares desde un punto de vista estructural, aunque la del fago presenta un control alostérico distinto al de la de *E. coli* y no se bloquea por la acumulación de desoxirribonucleótidos trifosfatos (Thelander y Reichard, 1979; Berglund, 1969).

La tiorredoxina de T4 tiene 87 aminoácidos y no presenta homología con la de *E. coli* (Sjöberg y Holmgren, 1972), excepto en su estructura terciaria con el sitio activo situado en una protuberancia de la molécula (Söderberg *et al.*, 1978). Por lo tanto, la tiorredoxina de T4 y de *E. coli* son ejemplos de moléculas con plegamiento parecido pero distinta estructura primaria.

La tiorredoxina de T4 es también reducida por el glutatión y tiene por tanto actividad glutarredoxina (Holmgren, 1978). De hecho las estructuras primarias de la tiorredoxina de T4 y la glutarredoxina de *E. coli* son claramente homólogas con un 32% de identidad (Höög *et al.*, 1983). No obstante, a diferencia de la glutarredoxina de *E. coli* la tiorredoxina de T4 también puede reaccionar con la tiorredoxina reductasa de *E. coli*, lo que optimizaría la síntesis del ADN de T4 utilizando dos vías distintas desde el NADPH hasta la ribonucleótido reductasa (Berglund y Holmgren, 1975). El potencial redox de la tiorredoxina de T4 es de  $-0,23$  V, valor más alto que el de la tiorredoxina de *E. coli* ( $-0,26$  V), lo que explica que la tiorredoxina reductasa de la bacteria reduzca preferentemente a la tiorredoxina del fago. Esto, junto con la especificidad por su ribonucleótido reductasa explicaría que tras la infección se use preferentemente el sistema inducido por el fago (Holmgren, 1985).

En resumen, la tiorredoxina de T4 se ajusta a los requerimientos de la infección del fago ya que la ribonucleótido reductasa del fago no funciona con la tiorredoxina del hospedador y, por tanto, la poca cantidad de glutarredoxina presente en las bacterias no sería suficiente para la replicación del fago. La modificación de un gen de la "glutarredoxina" en el sentido de presentar actividad con la tiorredoxina reductasa de *E. coli* permitiría al fago dirigir todo el poder

reductor del NADPH a su ribonucleótido reductasa. Además, la ribonucleótido reductasa de *E. coli* parece estar inactiva durante la infección de T4 debido a que la tiorredoxina del hospedador se encuentra en estado oxidado (Holmgren, 1985).

## **I.2. GLUTARREDOXINA**

La glutarredoxina es, al igual que la tioredoxina, una proteína pequeña y resistente al calor, inicialmente descubierta como donador de electrones dependiente de GSH de la ribonucleótido reductasa de *E. coli* (Holmgren, 1976; Holmgren, 1979d). La glutarredoxina oxidada es reducida por GSH, que a su vez es reducido por la glutatión reductasa y en última instancia por NADPH, lo que constituye el sistema glutarredoxina. La glutarredoxina participa no sólo en la reducción de la ribonucleótido reductasa sino también en la reducción de la PAPS reductasa, en la asimilación de sulfato y como disulfuro reductasa, aunque únicamente con moléculas de bajo peso molecular (Kren *et al.*, 1988). A diferencia de la tioredoxina, la glutarredoxina no es reducida por la tioredoxina reductasa y no tiene actividad proteína disulfuro reductasa (Gleason y Holmgren, 1988). La glutarredoxina ha demostrado poseer importantes similitudes con otros grupo de proteínas eucarióticas denominadas tioltransferasas (Askelöf *et al.*, 1974). Ya que la estructura de la glutarredoxina muestra un sitio de unión al glutatión, se ha propuesto el nombre de glutarredoxina mejor que el de tioltransferasas para este grupo de enzimas (Holmgren, 1979d)

### **I.2.1. Glutarredoxina de *E. coli***

En 1974 Chamberlin describió una estirpe de *E. coli* incapaz de permitir el crecimiento del fago T7, demostrándose que el citado fenotipo era causado por la deficiencia en tioredoxina (Holmgren *et al.*, 1978). Trabajando con esta estirpe Holmgren (1979d) aisló una nueva proteína que denominó glutarredoxina y que suple a la tioredoxina como un eficiente donador de electrones de la ribonucleótido reductasa de la bacteria.

#### ***Estructura y localización intracelular de la glutarredoxina***

La secuencia de la glutarredoxina de *E. coli* se ha determinado por secuenciación de la proteína (Höög *et al.*, 1983) y el gen ha sido clonado (Höög *et al.*, 1986). La proteína consta de 85 aminoácidos con un peso molecular de 10.000 daltons, tiene carácter ácido (pI=4,5) y posee dos residuos de cisteína en el sitio activo (Cys-Pro-Tyr-Cys).

La sobreexpresión de la proteína de *E. coli* (Höög *et al.*, 1986; Björnberg y Holmgren, 1991) ha permitido determinar su estructura tridimensional mediante resonancia magnética nuclear tanto de la forma reducida como de la oxidada (Sodano *et al.*, 1991a; b). La glutarredoxina reducida presenta tres  $\alpha$ -hélices y cuatro hojas plegadas  $\beta$ .

Existen diferencias entre la glutarredoxina de mamífero y la de *E. coli*, que es la única glutarredoxina de bacterias aislada y caracterizada hasta la fecha: (i) la enzima de *E. coli* es ácida y la de mamíferos básica, (ii) la de mamíferos tiene dos residuos extras de cisteína mientras que la de *E. coli* tiene sólo los dos del sitio activo, (iii) la glutarredoxina de *E. coli* es una proteína más corta (85 aminoácidos frente a los 105/106 de mamíferos) ya que faltan los 11 aminoácidos del extremo N-terminal y 9 ó 10 del extremo C-terminal y carece del segundo par de residuos de cisteína, y (iv) la actividad transhidrogenasa de la de mamíferos es entre dos y tres veces más alta que la de la bacteria (Wells *et al.*, 1993).

Mediante anticuerpos anti-Grx de *E. coli* y usando técnicas de microscopía electrónica esta proteína se ha localizado únicamente en una posición cercana a la membrana celular, tanto en el espacio periplásmico como en manchas que posiblemente sean mesosomas (Nygren *et al.*, 1981). Estos mesosomas son orgánulos de membranas intracelulares que estan involucrados en una gran variedad de procesos, entre los que destacan la producción de energía, la replicación del ADN y segregación y división celular (Wells *et al.*, 1993).

### ***Funciones de la glutarredoxina***

La glutarredoxina reducida de *E. coli* muestra para su ribonucleótido reductasa una  $K_m$  de 0,15  $\mu M$ , diez veces más baja que la de la tiorredoxina (1,3  $\mu M$ ) (Holmgren, 1979d). La actividad glutarredoxina es dependiente de glutatión reductasa ya que el glutatión oxidado es un fuerte inhibidor de la reacción. De hecho, sólo en presencia de una alta razón  $[GSH]/[GSSG]$  se promoverá la síntesis de ribonucleótidos, lo que constituye un posible control en la síntesis de ADN (Holmgren, 1979a).

Inicialmente se identificó a la tiorredoxina como donador de electrones en la reducción de sulfato (Tsang y Schiff, 1976). Posteriormente, trabajando con estirpes deficientes en tiorredoxina se identificó a la glutarredoxina como el

donador alternativo de electrones para la PAPS reductasa (Tsang, 1981). Los valores *in vitro* de  $K_m$  para la PAPS reductasa son de 2,5  $\mu M$  para la glutarredoxina y 6  $\mu M$  para la tiorredoxina, respectivamente (Kren *et al.*, 1988).

Mientras que la tiorredoxina y glutarredoxina son intercambiables como donadores de electrones en la reducción de ribonucleótidos y de sulfato, la glutarredoxina no puede sustituir a la tiorredoxina en otras muchas funciones. Así, la Grx de *E. coli* no sustituye a la Trx en el complejo de la ADN polimerasa de T7 ni participa en el proceso de ensamblaje de los fagos filamentosos f1 y M13 (Wells *et al.*, 1993). También se sabe que sólo la Trx participa en la reducción de metionina sulfóxido (Fuchs y Carlson, 1981), aunque está por determinar si la Grx puede sustituir a la Trx en la reducción de residuos de metionina sulfóxido unidos a proteína (Brot *et al.*, 1981).

### *El gen de la glutarredoxina*

El gen de la glutarredoxina de *E. coli* ha sido clonado y secuenciado y se localiza en el minuto 19 (Höög *et al.*, 1986). Dicho gen presenta diversas particularidades y diferencias con el gen de la tiorredoxina. Así, el codón de iniciación de la traducción AUG está precedido por otro posible sitio de iniciación de traducción en la posición -15 y que está en fase con la región codificante. El péptido resultante Met-Arg-Arg-Glu-Ile es demasiado corto y demasiado hidrofílico para ser considerado como péptido señal (Kreil, 1981). A diferencia del gen de la tiorredoxina que no expresa su putativo péptido señal (Matsumoto *et al.*, 1986) si se ha descrito la expresión de una glutarredoxina con los cinco aminoácidos adicionales en su extremo N-terminal (Sandberg *et al.*, 1991).

El codón de inicio de la traducción está precedido por dos sitios de unión del ribosoma parcialmente solapados. La distancia entre este codón de iniciación AUG y estos sitios de unión al ribosoma están dentro de los límites usuales (Gold *et al.*, 1981). El gen de la glutarredoxina contiene tres posibles promotores todos con sus correspondientes secuencias -10 y -35. Aún no se sabe si uno de estos promotores se usa preferentemente o se producen diferentes ARNm con distintas longitudes (Wells *et al.*, 1993). La región codificante del gen de la glutarredoxina termina con un codón de fin de mensaje en la posición 256. Otros dos codones de terminación extras, en fase con la región codificante, se encuentran en las posiciones 280 y 292. En el extremo 3' se localiza una secuencia rica en pares



G:C centrada en la posición 278 que podría actuar como una señal de terminación de la transcripción independiente de rho (Höög *et al.*, 1986).

Finalmente, el gen de la glutarredoxina utiliza un número considerable de codones raros, sin seguir el patrón típico de uso de codones en genes altamente expresados en *E. coli* (Gouy y Gautier, 1982). La media de estos codones raros en proteínas no reguladoras de *E. coli* es del 4% mientras que para la glutarredoxina es del 10%. Esta alta frecuencia es característica de proteínas reguladoras expresadas en baja cantidad (Konisberg y Godson, 1983). En comparación, el gen de la tiorredoxina tiene una frecuencia normal de 2,8% (Höög *et al.*, 1984) característica de proteínas altamente expresadas. Esta diferencia en el uso de codones raros sugiere una posible explicación de la gran diferencia entre la cantidad de tiorredoxina y glutarredoxina en *E. coli* (Höög *et al.*, 1986) e implicaría que la glutarredoxina podría tener un papel regulador más importante que la tiorredoxina.

### 1.2.2. Glutarredoxina en otros procariotas

Hasta la fecha la única glutarredoxina, propiamente dicha, descrita en procariontes es la proteína de *E. coli*. Sin embargo, una proteína similar se ha aislado del metanógeno anaeróbico estricto *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Schlicht *et al.*, 1985). Aunque por sus propiedades catalíticas y estructurales, esta proteína podría incluirse dentro del grupo de las glutarredoxinas también presenta una serie de particularidades que la diferencian de la de *E. coli* (McFarlan *et al.*, 1992).

La proteína de *M. thermoautotrophicum* pertenece a la superfamilia de proteínas pequeñas con un centro activo redox ditiol/disulfuro que incluye a tiorredoxinas y glutarredoxinas. Aunque inicialmente se la clasificó como tiorredoxina (Schlicht *et al.*, 1985), la secuencia de su centro activo -Cys-Pro-Tyr-Cys- es típico de las glutarredoxinas. La identidad de aminoácidos entre esta proteína y el resto de las glutarredoxinas es sólo del 20%. No obstante, la 'glutarredoxina' del metanógeno muestra claras diferencias con las otras glutarredoxinas al carecer de asparragina, glutamina, histidina y triptófano. Se trata de la 'glutarredoxina' más ácida (pI 4,2) secuenciada hasta la fecha (McFarlan *et al.*, 1992). A pesar de que sólo hay 14 residuos conservados entre

las glutarredoxinas de *M. thermoautotrophicum* y *E. coli*, estas dos proteínas al igual que las restantes glutarredoxinas presentan estructuras secundarias similares.

La glutarredoxina de *M. thermoautotrophicum* se comporta como una disulfuro reductasa ya que reduce la ribonucleótido reductasa de *E. coli* en presencia de DTT y dihidrolipoato, aunque su  $K_m$  es mucho mayor que las de la tiorredoxina y glutarredoxina. No obstante esta proteína no funciona con la tiorredoxina reductasa de *E. coli* ni con la ribonucleótido reductasa de *C. nephridii*. Además no muestra reactividad cruzada con anticuerpos contra tiorredoxina y glutarredoxina de *E. coli*. Aún más sorprendentemente, la 'glutarredoxina' de *M. thermoautotrophicum* no funciona como glutatión-disulfuro oxidoreductasa en presencia de glutatión y glutatión reductasa. Aunque se desconoce la razón de este comportamiento, el hecho de que presente una carga total negativa podría impedir la unión del glutatión ya que éste también está cargado negativamente. Por tanto, y al igual que la glutarredoxina del fago T4 no puede ser clasificada definitivamente ni como tiorredoxina ni como glutarredoxina, ya que comparte propiedades esenciales de ambas proteínas. Un nombre más apropiado podría ser proteína disulfuro reductasa (McFarlan *et al.*, 1992).

*M. thermoautotrophicum* carece de glutatión,  $\gamma$ -glutamylcisteína, cisteína, dihidrolipoato, dihidrolipoamida etc., así de como otra serie de tioles (McFarlan *et al.*, 1992). Se ha descrito un sistema reductor dependiente de ferredoxina en el anaerobio estricto *Clostridium pasteurianum* (Hammel *et al.*, 1983). Este organismo, que también carece de glutatión usa la ferredoxina como agente reductor de una pequeña proteína identificada como tiorredoxina. El sistema completo está constituido por hidrógeno molecular, una hidrogenasa, ferredoxina, ferredoxina-tiorredoxina reductasa y tiorredoxina. Se ha sugerido un sistema similar para la reducción de ribonucleótidos en *M. thermoautotrophicum* salvo que la tiorredoxina sería sustituida por esa 'glutarredoxina' (McFarlan *et al.*, 1992).

### **I.3. CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS DE LA DEFICIENCIA EN *Trx*, *TRasa* y/o *Grx***

Mutantes de *E. coli* deficientes en tiorredoxina presentan una tasa de reducción de ribonucleótidos similar al silvestre. Este descubrimiento condujo al aislamiento de la glutarredoxina que sustituye de manera efectiva a la tiorredoxina tanto en la reducción de ribonucleótidos como en la reducción de sulfato (Holmgren, 1979; Tsang, 1981). Posteriormente se demostró que la glutarredoxina no era una enzima esencial en *E. coli* (Russel y Holmgren, 1988). Dado que tiorredoxina y glutarredoxina no son esenciales en *E. coli* se intentó construir dobles mutantes deficientes en ambas proteínas mediante transducción con el fago P1. En medio mínimo con casaminoácidos no se obtuvieron transductantes viables. En medio rico, sin embargo, se obtuvieron transductantes inestables de crecimiento lento, que con alta frecuencia originaban células de mejor crecimiento. Uno de estos transductantes se conservó denominándose A410. Dicha estirpe sólo crece en medio mínimo con cisteína, lo que indica un defecto en la ruta de asimilación del sulfato (Russel y Holmgren, 1988). Posteriormente estos mismos autores demostraron que el doble mutante *grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup>* acumulaba una mutación adicional en el gen *cysA* que impedía la incorporación del sulfato extracelular, de ahí su requerimiento en cistina. Sin embargo, estos mutantes dobles eran capaces de reducir ribonucleótidos, lo cual implicaría la existencia de un tercer donador de electrones para la ribonucleótido reductasa, concluyendo que *Trx* y *Grx* son esenciales para la asimilación de sulfato, pero no para la reducción de ribonucleótidos (Russel *et al.*, 1990).

Por otro lado, es interesante señalar que una mutación en la enzima tiorredoxina reductasa (*trxB*) provoca aumentos de los niveles de *Grx* entre 3 y 10 veces (Fuchs, 1989).

#### ***I.4. RIBONUCLEÓTIDO REDUCTASA***

La ribonucleótido reductasa (RDRasa) es una enzima esencial en todos los organismos estudiados hasta el momento al proporcionar los desoxirribonucleótidos necesarios para la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Thelander y Reichard, 1979; Stubbe, 1990). Esta enzima cataliza la reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos mediante la sustitución del grupo hidroxilo del carbono 2 de la ribosa por un hidrógeno, según el mecanismo descrito en la Figura 2 pág. 6 (Stubbe, 1989; Reichard, 1993). Tiorredoxina y glutarredoxina son los donadores de electrones conocidos para la ribonucleótido reductasa (Holmgren, 1989). Estas proteínas han sido tratadas ampliamente en los apartados I.1. y I.2. de esta Introducción. *In vitro*, DTT y ácido lipoico son activos a concentraciones mM reduciendo la RDRasa, mientras que tiorredoxina y glutarredoxina lo son a concentraciones  $\mu$ M (Thelander y Reichard, 1979).

El descubrimiento del sistema glutarredoxina demostró que la tiorredoxina no es esencial para la reducción de ribonucleótidos y puso en cuestión el papel de ésta en dicho proceso (Holmgren, 1976). De forma análoga, la obtención de mutantes dobles deficientes en tiorredoxina y glutarredoxina cuestionó el papel de esta última, postulándose la existencia de un tercer donador de electrones para la ribonucleótido reductasa (Russel *et al.*, 1990). De acuerdo con esta idea se ha comprobado que células de mamífero muy activas en síntesis de ADN y con mucha ribonucleótido reductasa carecen de tiorredoxina y glutarredoxina (Engström *et al.*, 1984; Rozell *et al.*, 1993)

La enzima ribonucleotido reductasa está exquisitamente regulada y, debido a su importante papel la síntesis de ADN, ha sido ampliamente estudiada en gran número de organismos (Elledge *et al.*, 1992; Harder, 1993).

### I.4.1. Ribonucleótido reductasa de *Escherichia coli*

#### *Aspectos estructurales*

La enzima consiste en dos subunidades no idénticas (Brown *et al.*, 1969) denominadas proteínas R1 y R2 (Fontecave *et al.*, 1992) en una estequiometría 1:1, cada una de las cuales a su vez está constituida por dos protómeros idénticos (Brown y Reichard, 1969a; Thelander, 1973) (Figura 5). Cada subunidad por separado carece de actividad. La unión de ambas subunidades requiere iones  $Mg^{2+}$  y es débil (Brown y Reichard, 1969a). Los genes que codifican la RDRasa de *E. coli* se denominan *nrdA* y *nrdB*, se localizan en el minuto 48 del cromosoma entre los genes *nalA* y *glpT* y forman un operón (Fuchs, 1977).

La subunidad R1 tiene un peso molecular de 171.400 daltons y se aísla como un homodímero de la cadena polipeptídica codificada por el gen *nrdA* (Thelander, 1973; Carlson *et al.*, 1984; Stubbe, 1990). Contiene dos tipos de sitios reguladores, uno que regula la especificidad por el sustrato y otra que controla la actividad de la enzima (Brown y Reichard, 1969b; von Döbeln y Reichard, 1976). La subunidad R1 une los cuatro ribonucleósidos difosfato como sustrato, así como diversos desoxirribonucleósidos trifosfatos y ATP como efectores alostéricos. El sitio activo de la enzima está compartido entre ambas subunidades, de forma que la R1 proporciona los grupos tiólicos activos en el proceso de catálisis y la R2 contribuye con el radical libre (Thelander, 1974; Elledge *et al.*, 1992). A partir de la secuencia de aminoácidos de R1 se han identificado 11 residuos de cisteína con grupos tiólicos activos (Lin *et al.*, 1987; Åberg *et al.*, 1989; Mao *et al.*, 1989; Stubbe, 1990) de las que 5 participan en el proceso de reducción de ribonucleótidos. Dos de ellos aceptan el electrón de la tiorredoxina o glutarredoxina reducidas, otras dos participan directamente en la reducción del carbono C2 de la ribosa y la quinta parece ser la responsable de captar el hidrógeno del carbono C3 iniciando la reacción (Mao *et al.*, 1992a; b; c).

La subunidad pequeña o R2 es un homodímero de 86.500 daltons (Reichard, 1993) del péptido codificado por el gen *nrdB* (Carlson, 1984; Stubbe, 1990). Cada subunidad contiene cuatro átomos de hierro, dos por cadena polipeptídica (Lynch *et al.*, 1989; Nordlund *et al.*, 1990) y un radical libre que por experimentos de sustitución de isótopos se han asignado al residuo Tyr-122 (Sjöberg *et al.*, 1977; Sjöberg *et al.*, 1978; Petersson *et al.*, 1980; Larsson y Sjöberg, 1986).

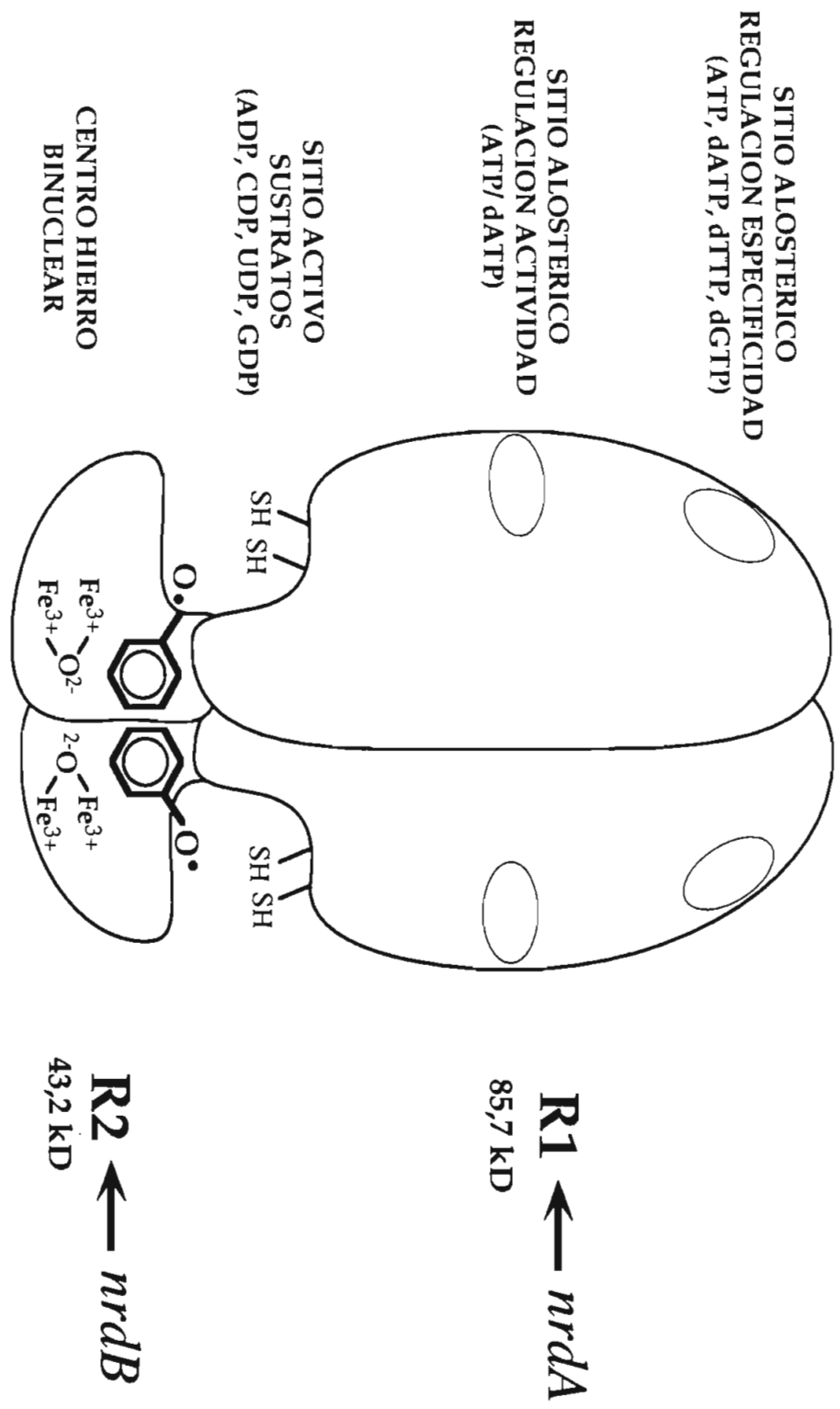


Figura 5. Estructura de la ribonucleótido reductasa de *E. coli*.

Por estudios de rayos X se ha comprobado que este residuo se encuentra en una cavidad de la proteína (Nordlund *et al.*, 1990) a unos 10 Å de su superficie. El grupo hidroxilo de la tirosina está a 5 Å del átomo de hierro más cercano. Este hecho, junto con el de estar embuido dentro de la proteína, contribuye a la extraordinaria estabilidad del radical.

### *Mecanismo de reacción*

El mecanismo de reducción propuesto por Stubbe (1989) es el modelo comúnmente aceptado (Figura 6). Esta hipótesis predice que el radical tirosilo inicia el proceso catalítico mediante la captura de un hidrógeno. La reducción del radical tirosilo generaría un radical proteínico centrado en la cisteína 439. Este radical captaría el hidrógeno del carbono 3' de la ribosa formando un radical 3'-ribonucleótido. Seguidamente se protonaría el grupo hidroxilo del carbono 2', en un proceso catalizado por uno de los grupos SH del sitio activo, y se generaría un intermediario catiónico que perdería una molécula de agua. Este intermediario sería reducido por transferencia de dos electrones del otro grupo tiol con la consiguiente formación de un puente disulfuro en el centro activo originando un radical 3'-radical-2'-desoxirribonucleótido. Este radical sería finalmente reducido a su correspondiente desoxirribonucleósido difosfato por oxidación del residuo cisteína 439, originando de nuevo el radical centrado en él.

No obstante, mediante análisis de rayos X se ha visto que el radical tirosilo está a una distancia de 10 Å de la superficie de la molécula y por tanto no podría interaccionar directamente con el sitio catalítico en la subunidad R1, lo cual sugeriría una función más indirecta para dicho radical en el proceso de reducción (Nordlund *et al.*, 1990; Reichard, 1993).

Por comparación de secuencias y usando proteínas modificadas por mutagénesis dirigida se han identificado 5 residuos cisteína con grupos tiólicos activos directamente implicados en el proceso de reducción de ribonucleótidos (Figura 7) (Nilsson *et al.*, 1988a; b; Lin *et al.*, 1987; Åberg *et al.*, 1989; Mao *et al.*, 1989; Stubbe, 1990).

Los residuos de cisteína 754 y 759 reciben los electrones de la tiorredoxina o glutarredoxina reducidas (Mao *et al.*, 1992a) y se los transmiten a otros dos residuos cisteína, 225 y 462, que participan directamente en la reducción del carbono 2' de la ribosa (Mao *et al.*, 1992b). Finalmente, el residuo de

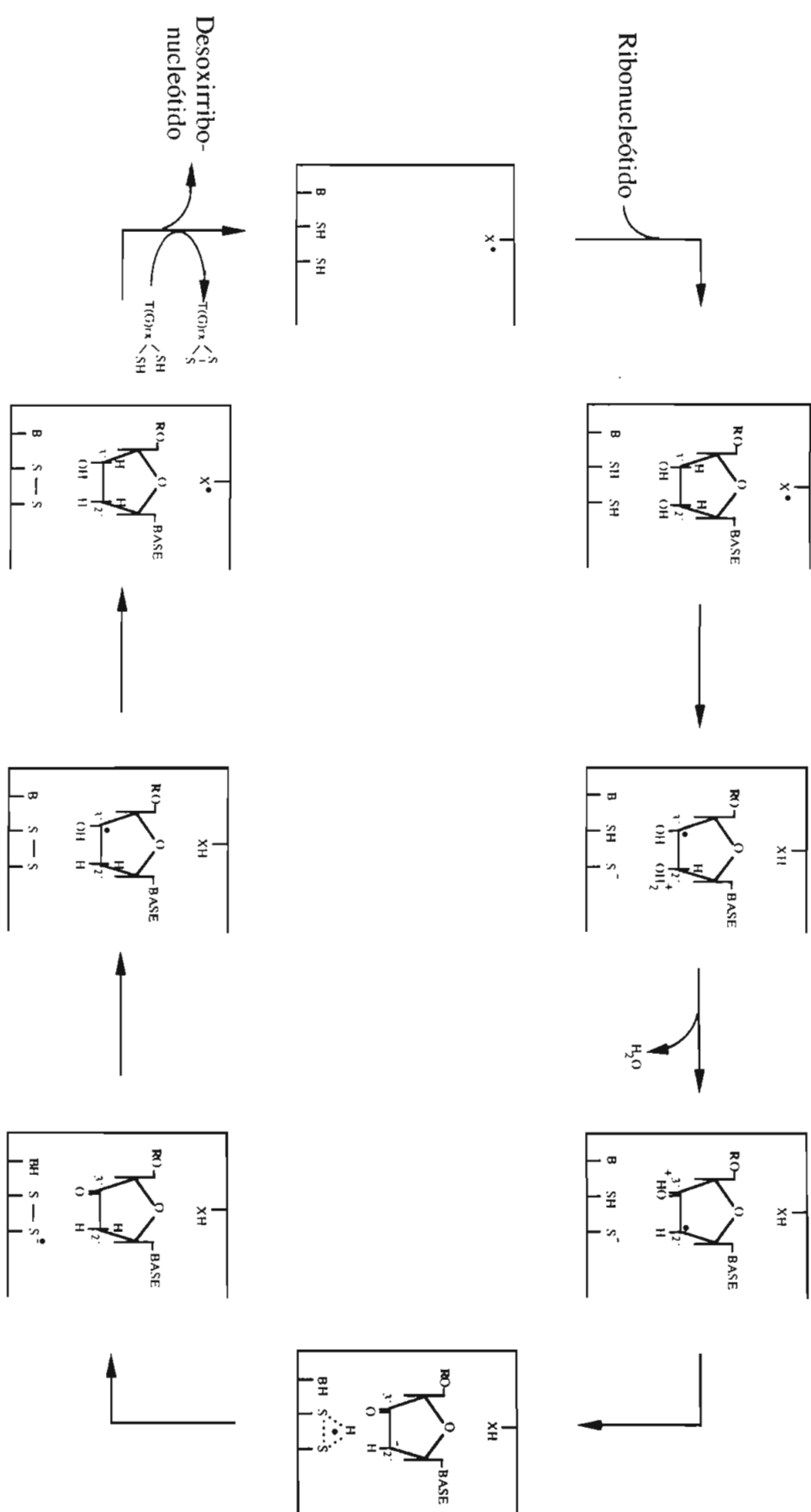
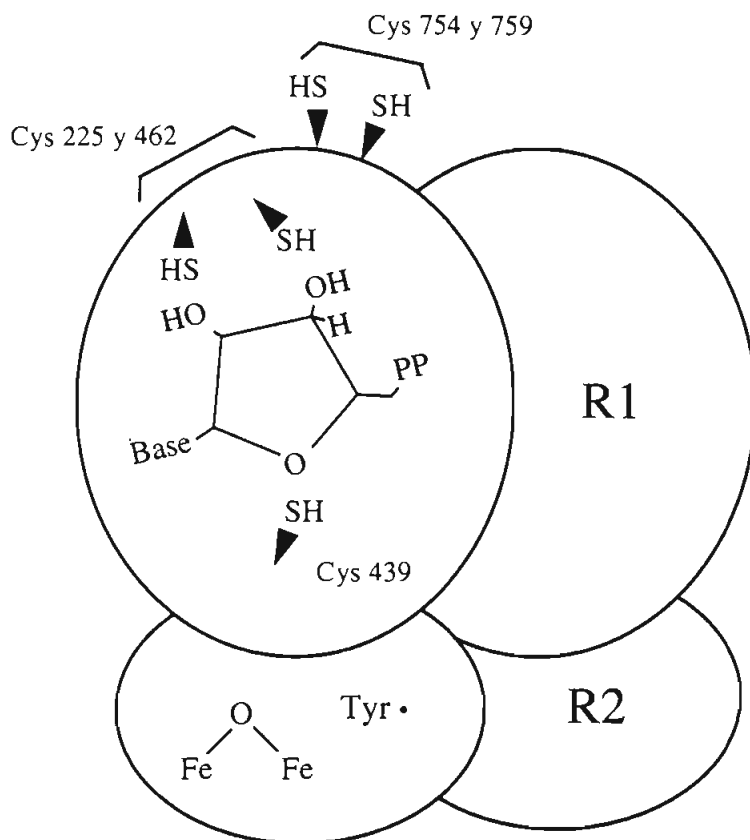


Figura 6. Mecanismo de reacción de la RDRasa de *E. coli*.





**Figura 7.** Cisteínas de la subunidad R1 de la RDRasas de *E. coli* implicadas en el proceso de reducción de ribonucleótidos.

cisteína 439, más cercano al radical tirosilo, sería activado por éste convirtiéndolo en el correspondiente radical tiólo ( $-S^{\bullet}$ ), encargado de captar el hidrógeno del carbono 3' de la ribosa que desencadena el proceso (Mao *et al.*, 1992c).

### **Regulación de la actividad enzimática**

La ribonucleótido reductasa de *E. coli* está regulada mediante un complicado mecanismo de control alostérico ampliamente estudiado mediante experimentos de cinética y de unión (Thelander y Reichard, 1979; Reichard, 1987). La subunidad mayor R1 posee una serie de sitios alostéricos que regulan la especificidad por sustrato de la enzima. De los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato únicamente dCTP no se une a estos sitios y su acumulación en la célula no modula la actividad enzimática (Reichard, 1988). Estos sitios (llamados *h* debido a su alta afinidad por dATP) unen ATP, dATP, dTTP, dGTP. Con ATP unido reducen CDP y UDP, con dTTP reducen GDP y con dGTP reducen ADP.

La unión de los efectores provoca cambios conformacionales en el sitio activo de la enzima, induciendo uniones preferenciales de uno u otro sustrato (Thelander y Reichard, 1979; Reichard, 1993).

Además hay otros sitios reguladores que unen ATP y dATP y se llaman sitios *I* debido a la baja afinidad de los mismos por dATP. Cuando tienen unido ATP la enzima es activa, mientras que cuando tiene unido dATP la enzima es inactiva (Brown y Reichard, 1969a). La unión de estos efectores regula, por tanto, el nivel general de actividad, siendo ATP un efector positivo y dATP un efector negativo.

La glutarredoxina, que carece de actividad proteína-disulfuro reductasa, no muestra actividad con la forma oxidada de la ribonucleótido reductasa (Holmgren, 1979). Por el contrario, *in vitro*, la tiorredoxina puede activar a la RDRasa, reduciendo disulfuros estructurales, y actuar como donadora de electrones en la reacción enzimática. Por tanto, la tiorredoxina podría regular, al menos en *E. coli*, la actividad ribonucleótido reductasa mediante un control "tiol-redox".

En mamíferos la actividad RDRasa varía enormemente durante el ciclo celular que es máxima en la fase S y apenas detectable durante las restantes etapas. Es interesante señalar que estas variaciones se deben casi exclusivamente a cambios en el contenido de R2 mientras que la cantidad de R1 permanece invariable durante las distintas fases del ciclo celular (Eriksson y Martin, 1981; Eriksson *et al.*, 1984; Engström *et al.*, 1984; Mann *et al.*, 1987). En *E. coli* se ha demostrado que la actividad también depende de la etapa del ciclo celular, siendo máxima en el momento de iniciarse la síntesis de ADN (Sun y Fuchs, 1992). En mamíferos también se ha demostrado que la fosforilación de la ribonucleótido reductasa podría jugar un importante papel en la regulación de su actividad (Chan *et al.*, 1993). Posiblemente este mecanismo también podría actuar en bacterias.

### ***Regulación a nivel de síntesis***

Inhibidores de la replicación del ADN, mutantes *dna* condicionales, o ayuno de timina en bacterias auxotróficas provocan un incremento de entre 10 y 15 veces la actividad de la ribonucleótido reductasa (Filpula y Fuchs, 1977; Hanke and Fuchs, 1983a). Esta inducción, que requiere la síntesis de nuevas moléculas de

enzima, es debido a un incremento en la tasa de transcripción del operón *nrdAB* y es precedida por la síntesis de una o varias proteínas reguladoras (Filpula y Fuchs, 1977; Hanke and Fuchs, 1983b, 1984)

En *E. coli* los dos genes del operón *nrd* están contiguos y se transcriben en un mismo mensajero policistrónico. Hanke y Fuchs (1983a) demostraron que la regulación de la expresión de la RDRasa se lleva a cabo a nivel de transcripción. El ARNm policistrónico tiene un tamaño de 3,2 kb suficiente para codificar los polipéptidos de ambas subunidades. Sin embargo, por experimentos de hibridación se ha identificado otro mensajero de 1,8 kb. Aunque inicialmente se pensó que este segundo ARNm podía ser un producto de degradación del de 3,2 kb, la caracterización de la región intergénica entre *nrdA* y *nrdB* indica la existencia de un promotor interno que controlaría la expresión de la subunidad pequeña (Fuchs y Tuggle, 1986). De hecho se ha demostrado que esta región intergénica presenta las típicas secuencias situadas a -35 y -10 con respecto al inicio de la transcripción de *nrdB* y que muestra una alta homología con las detectadas en el resto de los promotores de *E. coli* (Gibert *et al.*, 1990). La fuerza de este promotor interno es 14 veces menor que la del promotor situado al principio del gen *nrdA*. Parece ser que la expresión de los genes *nrd* a partir del primer promotor está en parte regulado por la respuesta SOS, mientras que el promotor interno no parece estar sujeto a este control.

Por otro lado, el papel de los genes *recA* y *lexA* en la regulación de la ribonucleótido reductasa es bastante controvertido. Igualmente la inducción de la actividad reductasa fue considerada independiente de las proteínas codificadas por los genes *recA*, *recB*, *recC* y *lexA* (Filpula y Fuchs, 1977). Sin embargo, los genes *recA* y *lexA* han sido implicados recientemente en la transcripción de los genes *nrd*, aunque este fenómeno ha sido considerado como una consecuencia indirecta de la expresión de uno o varios genes (Gibert *et al.*, 1990).

Se han identificado dos sitios de regulación positiva: uno centrado en la posición -156 del inicio de la transcripción y otro localizado entre las posiciones -139 y -122 (Augustin *et al.*, 1994). También se han identificado dos proteínas que se unen a determinadas regiones del promotor. La primera, que se une al sitio -156 es la proteína Fis, factor estimulador de la resolución de estructuras de recombinación (Haffter y Bickle, 1987; Ball y Johnson, 1991). La proteína Fis actúa también como activador transcripcional de los promotores de los rRNA y tRNA de *E. coli* y es capaz de unirse a sitios específicos de *oriC* (Bosch *et al.*,

1990; Gille *et al.*, 1991). La segunda proteína se une a dos secuencias de nueve pares de bases inmediatamente anterior a la región -35 del operón. Esta proteína ha sido identificada como la proteína de inicio de la replicación DnaA (Fuller *et al.*, 1984). Ambas proteínas parecen ser reguladores positivos de la expresión de los genes *nrd* (Augustin *et al.*, 1994).

La variación de la expresión de RDRasa varía a lo largo del ciclo celular y no depende de las proteínas Fis y DnaA pese a que anteriormente vimos que se unen a determinadas regiones del promotor. Se ha identificado una región rica en bases AT que estaría implicada en dicho fenómeno (Sun *et al.*, 1994)

Estudios sobre la expresión de la RDRasa en condiciones de estrés mutagénico se han realizado únicamente en células de mamífero y en levadura (Elledge y Davis, 1989; Hurta y Wright, 1992; Chen *et al.*, 1993; Amara *et al.*, 1994), detectándose alteraciones de los niveles tanto de actividad como de mensajero. Sin embargo, en bacterias no se ha realizado ningún estudio de este tipo aunque es muy probable que, de igual manera que en eucariontes, se produzcan alteraciones en la síntesis y actividad de la RDRasa para proporcionarle los desoxirribonucleótidos necesarios para el proceso de reparación.

### I.4.2. Otras ribonucleótido reductasas aeróbicas

La ribonucleótido reductasa de *E. coli* es la enzima más ampliamente estudiada, sirviendo de prototipo para todas las proteínas pertenecientes a esta clase. Existe un alto grado de homología entre la secuencia de aminoácidos de la subunidad pequeña de distintos organismos, deducida ésta a partir de la secuencia de nucleótidos. La subunidad pequeña de levadura presenta un 60 % de homología de aminoácidos con las correspondientes de ratón y cangrejo (Elledge y Davis, 1987); la homología entre la subunidad pequeña de *E. coli* y el fago T4 es de un 50%. De hecho, todas las subunidades pequeñas conocidas muestran identidad respecto del aminoácido correspondiente en 19 posiciones diferentes de la molécula (Sjöberg *et al.*, 1985).

En el caso de la enzima de mamíferos, los genes de las dos subunidades están localizados en cromosomas separados; en humanos el gen de la subunidad mayor se localiza en el cromosoma 11 y el de la pequeña en el 2 (Engström y Francke, 1985). También se han identificado secuencias inactivas relacionadas con la subunidad pequeña (pseudogenes) en los cromosomas 1 y X (Yang-Feng *et al.*, 1987).

En levadura se han identificado tres genes que codifican la ribonucleótido reductasa (Elledge *et al.*, 1992). Dos genes, RNR1 y RNR3, codifican la subunidad mayor, presentando un 80% de homología entre sí. RNR1 es un gen esencial, mientras que la delección de RNR3 no provoca ningún fenotipo. Sin embargo, RNR3 codifica para una proteína activa, ya que cuando se clona en un plásmido es capaz de complementar un alelo nulo de RNR1 (Elledge y Davis, 1990). Por el contrario, sólo un gen codifica en levadura la subunidad pequeña (Elledge y Davis, 1990; Hurd *et al.*, 1987) y también es un gen esencial. Los tres genes son inducibles a nivel de transcripción cuando son expuestos a agentes que bloquean la síntesis o provocan daños en el ADN. RNR1 es inducible de 3 a 5 veces, RNR2 unas 25 veces y RNR3 entre 100 y 500 veces (Elledge *et al.*, 1992).

### I.4.3. Ribonucleótido reductasa anaeróbica de *E. coli*

#### *Aspectos estructurales y mecanismo de acción*

La ribonucleótido reductasa anaeróbica de *E. coli* no ha sido estudiada con tanta profundidad como la enzima aeróbica. De hecho, la primera evidencia de que extractos de *E. coli* crecidos anaeróbicamente reducían ribonucleótidos fue en 1989 (Fontecave *et al.*, 1989). Extractos de *E. coli* crecida anaeróbicamente se incubaron bajo condiciones anaeróbicas, observándose que catalizaban una rápida conversión de CTP a dCTP. Esta actividad no fue inhibida ni por anticuerpos contra R1 o R2 ni por hidroxiaurea, un secuestrador del radical tirosilo de la subunidad R2. Estos resultados sugerían que los extractos crecidos anaeróbicamente contenían un nuevo tipo de ribonucleótido reductasa, que no utiliza un radical tirosilo durante su función. Por otro lado, parece ser que CTP y no CDP es el sustrato de la actividad enzimática, con lo cual la enzima se clasificó como una ribonucleósido trifosfato reductasa (Fontecave *et al.*, 1989). Otros resultados interesantes fueron que la actividad no dependía de adenosilcobalamina aunque era totalmente dependiente de S-adenosilmetionina, requiriendo además NADPH, iones magnesio y potasio y ditiotreitól (Eliasson *et al.*, 1992).

Tras un fraccionamiento proteínico, se han identificado tres componentes en el extracto anaeróbico de *E. coli*. Dos de ellos (denominados dA3 y dA1) se obtuvieron como proteínas homogéneas mientras que el tercero (denominado RT) aún requiere cierta purificación para su total identificación. El componente dA3 es la ribonucleósido trifosfato reductasa propiamente dicha. El gen que codifica dicha proteína (*nrdD*) ha sido secuenciado recientemente (Sun *et al.*, 1993). La enzima es un homodímero de 160 kD, y cada uno de los protómeros consiste en 712 aminoácidos. Su estructura se ajusta a las funciones de las subunidades R1 y R2 de la enzima aeróbica. Junto con los sitios de unión del sustrato y alostéricos característicos de R1 también se ha identificado en la enzima activa un centro férrico y un radical orgánico, característico de la subunidad R2 (Mulliez *et al.*, 1993). Sin embargo, tanto la naturaleza del radical, como la estructura de los átomos alrededor del centro férrico difieren entre ambos tipos de proteínas. Mediante técnicas de EPR parece ser que la agrupación es del tipo  $F_4-S_4$  a diferencia del centro férrico acoplado con oxígeno en el caso de R2.

Durante la purificación la reductasa anaeróbica pierde su actividad. La activación requiere una preincubación anaeróbica de la enzima con NADPH y

S-adenosilmetionina junto con las fracciones dAl y RT. La fracción dAl ha resultado una flavodoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa (Bianchi *et al.*, 1993a). Resultados recientes han permitido separar la fracción RT en dos fracciones activas: RTR que ha sido identificada como una flavodoxina con un peso molecular de 20 kD y RTF que es una fracción de bajo peso molecular pero que aún no ha sido caracterizada (Bianchi *et al.*, 1993b). RTR y RTF activan la enzima por separado, pero la actividad se incrementa más de diez veces cuando se encuentran juntas.

Basados en estas pruebas y por analogías con sistemas similares se ha propuesto un mecanismo de reacción (Reichard, 1993). La agrupación de hierro es reducida por el sistema de flavodoxina, que a su vez transfiere el electrón desde el NADPH. La agrupación Fe-S reducida transfiere el electrón a la S-adenosilmetionina generando un radical 5'-deoxiadenosilo. Finalmente este radical captura un átomo de hidrógeno de la Gly-681 para generar el radical proteínico activo en la reducción de ribonucleótidos.

### *Regulación de la actividad enzimática*

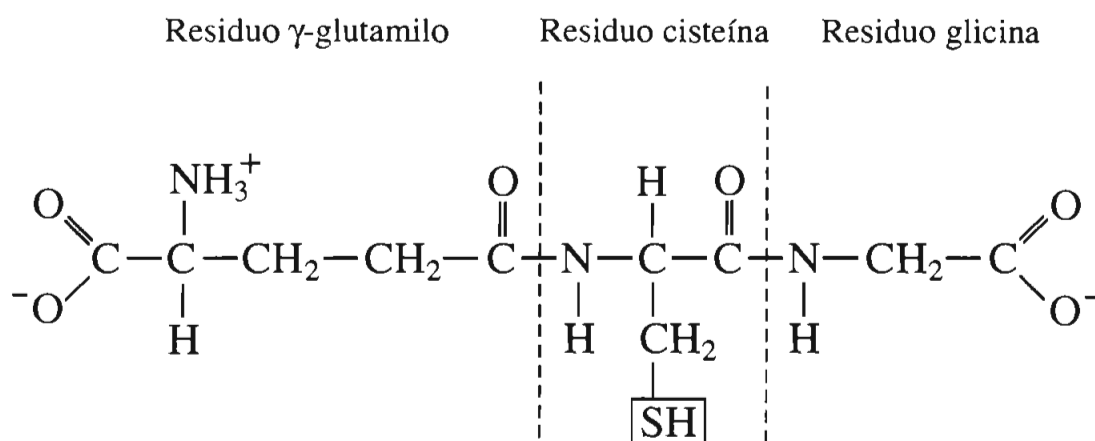
El mecanismo de regulación de la ribonucleótido reductasa anaeróbica aún no puede ser con seguridad clasificado como alostérico, debido a que no se han realizado experimentos de unión de efectores. Sin embargo, experimentos cinéticos preeliminares demuestran claramente que la especificidad de sustrato de la reductasa anaeróbica es gobernada por efectores específicos (Reichard, 1993). La enzima reduce, a una tasa lenta, cada uno de los cuatro ribonucleósidos trifosfatos. Dicha tasa se incrementa hasta 10 veces con el efector apropiado: ATP para la reducción de CTP y UTP, dTTP para la reducción de GTP, y dGTP para la reducción de ATP. La adición del efector inapropiado provoca una rápida inhibición de la actividad y dATP es siempre inhibitorio. Todos estos resultados son marcadamente similares al control alostérico de la enzima aeróbica (Reichard, 1993).

### 1.5. GLUTATIÓN

El glutatión es un tripéptido ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina) de amplia distribución entre los seres vivos. Su forma reducida presenta dos importantes características que constituyen la base de sus distintas funciones (Figura 8):

a) Su enlace peptídico  $\gamma$ -glutamilo lo hace insensible al ataque de las proteasas intracelulares y le permite participar en el transporte de varios aminoácidos al interior de la célula.

b) Su grupo tiol le permite participar en gran número de procesos redox.



**Figura 8. Estructura del glutatión reducido.** En el recuadro se muestra el grupo tiol del residuo de cisteína.

El glutatión participa en muchos procesos biológicos (Meister y Anderson, 1983) que pueden resumirse en los siguientes: (i) control del estado redox de muchas enzimas y proteínas estructurales, (ii) reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y distintos hidroperóxidos actuando como donador de electrones de las distintas glutatión peroxidasas, (iii) conjugación con diversos compuestos xenobióticos electrofílicos como parte de su detoxificación o activación metabólica, (iv) aceptor de radicales libres, que se neutralizan en una reacción química directa, (v) síntesis de prostaglandinas y leucotrienos y (vi) reducción de ribonucleótidos, como donador de electrones para la glutarredoxina. En la mayoría de las reacciones que se acaban de citar, el GSH se oxida a GSSG por lo que se hacen necesarios



mecanismos que vuelvan a restaurar la adecuada relación [GSH]/[GSSG]. Uno de estos mecanismos es la reducción del glutatión oxidado catalizada por la enzima glutatión reductasa que utiliza NADPH como fuente de electrones:



De todas las funciones del glutatión, las más relacionadas con este trabajo son su papel como donador de electrones de la glutarredoxina (ampliamente tratado en el apartado I.2.) y su papel en la acción genotóxica de agentes xenobióticos. En bacterias, varios estudios han demostrado las propiedades protectoras del GSH contra la letalidad de diversos agentes mutagénicos (Apontoweil y Berends, 1975; Kerklaan *et al.*, 1983). De la misma forma se le han atribuido propiedades antimutagénicas en base a los efectos observados tras la adición de GSH exógeno (Frei *et al.*, 1985; Josephy *et al.*, 1985). En otros casos, la conjugación del GSH con el xenobiótico, en vez de detoxificarlo, generaría intermediarios reactivos de mayor potencial mutagénico que el original. Este hecho ha sido claramente establecido para MNNG y DBE (Mohn *et al.*, 1983) en *E. coli* y *S. typhimurium* (Kerklaan *et al.*, 1983; 1985). Por otra parte, Glatt *et al.* (1983) y Ross *et al.* (1986) han demostrado la mutagenicidad del propio glutatión y de la cisteína.

La primera etapa de la síntesis de glutatión (Figura 9) es la formación de un enlace peptídico entre el grupo  $\gamma$ -carboxilo del glutamato y el grupo  $\alpha$ -amino de la cisteína, mediante una reacción catalizada por la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa, codificada por el gen *gshA*. La formación de este enlace peptídico requiere la activación del grupo  $\gamma$ -carboxilo por el ATP. El intermediario acil-fosfato resultante es posteriormente atacado por el grupo amino de la cisteína. Es interesante señalar que esta reacción es retroinhibida por GSH. En la segunda etapa, catalizada por la glutatión sintetasa codificada por el gen *gshB*, el ATP activa el grupo  $\alpha$ -carboxilo de la cisteína para permitir su condensación con el grupo  $\alpha$ -amino de la glicina (Meister y Anderson, 1983).

El estado fisiológico del glutatión lo mantienen dos rutas enzimáticas. Una es la ruta biosintética anteriormente explicada. En la otra, el glutatión oxidado (GSSG), producto de diversos procesos celulares, se reduce en una reacción catalizada por la enzima glutatión reductasa, consumiéndose poder reductor del

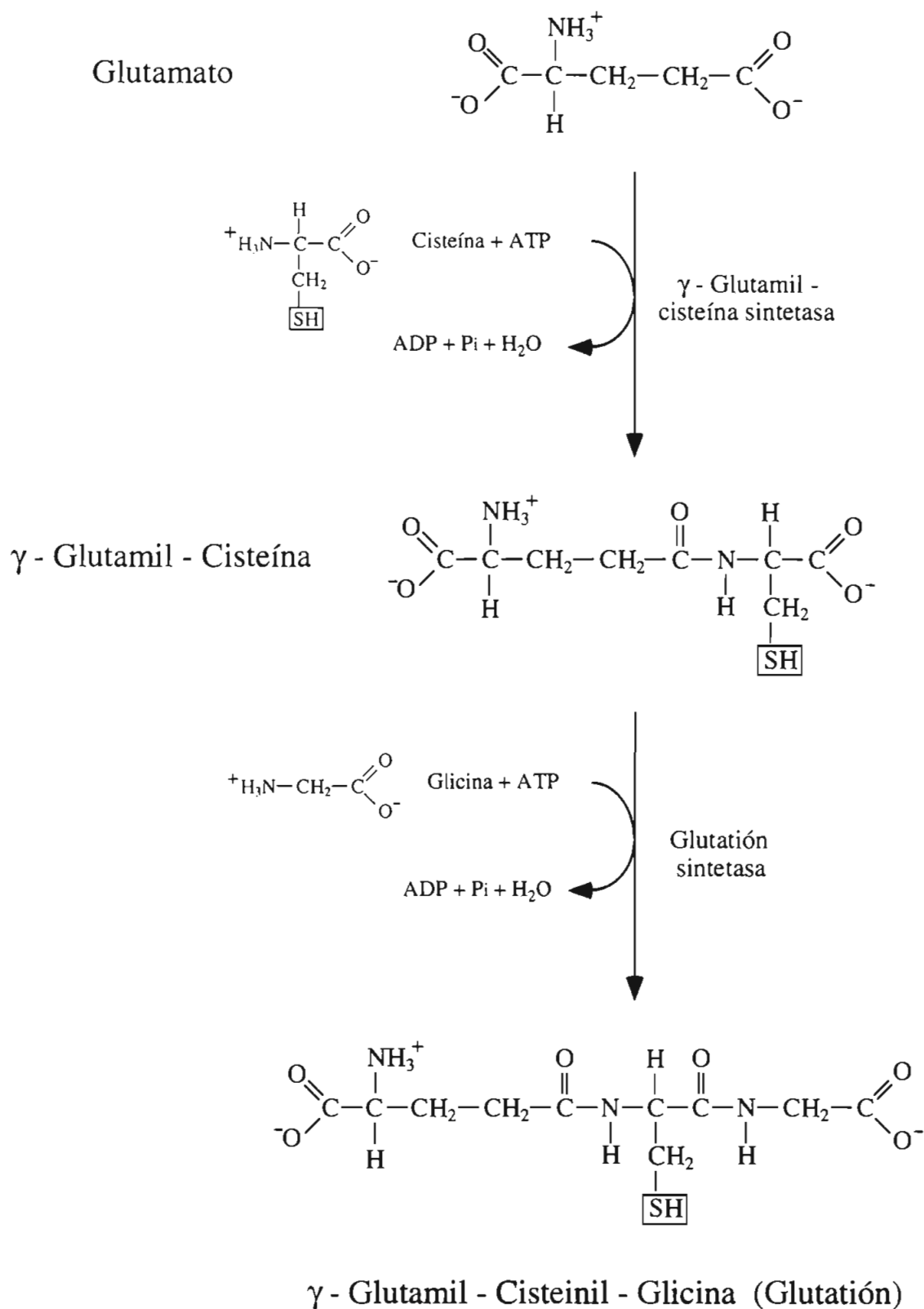


Figura 9. Esquema de la biosíntesis de glutatión reducido.

NADPH. Tanto en procariontes como en eucariontes la forma reducida del glutatión es mucho más abundante que la forma oxidada, por lo que en condiciones normales el estado celular es altamente reductor. En aquellos procariontes que poseen glutatión, el GSH constituye entre el 98% y 99% del glutatión total. Asimismo, se ha demostrado que la glutatión reductasa no es esencial para mantener este estado altamente reducido ya que mutantes de *E. coli* deficientes en dicha enzima mantienen una proporción de ~95% de la forma reducida (Tuggle y Fuchs, 1985). Alonso-Moraga *et al.* (1987) han estudiado los niveles de las tres formas de glutatión (reducido, oxidado y unido a proteínas) en mutantes de *E. coli* deficientes en glutatión reductasa, catalasa y biosíntesis de GSH. La forma reducida era mayoritaria en todas las estirpes con relaciones [GSH]/[GSSG] entre 590 y 110 en las estirpes silvestres; en mutantes deficientes en catalasa, glutatión reductasa y biosíntesis de glutatión esta relación descendió a 32. En dichos mutantes se observó un aumento de la concentración de GSSG, aunque los cambios más importantes afectaron a la concentración de disulfuros mixtos proteína-glutatión.

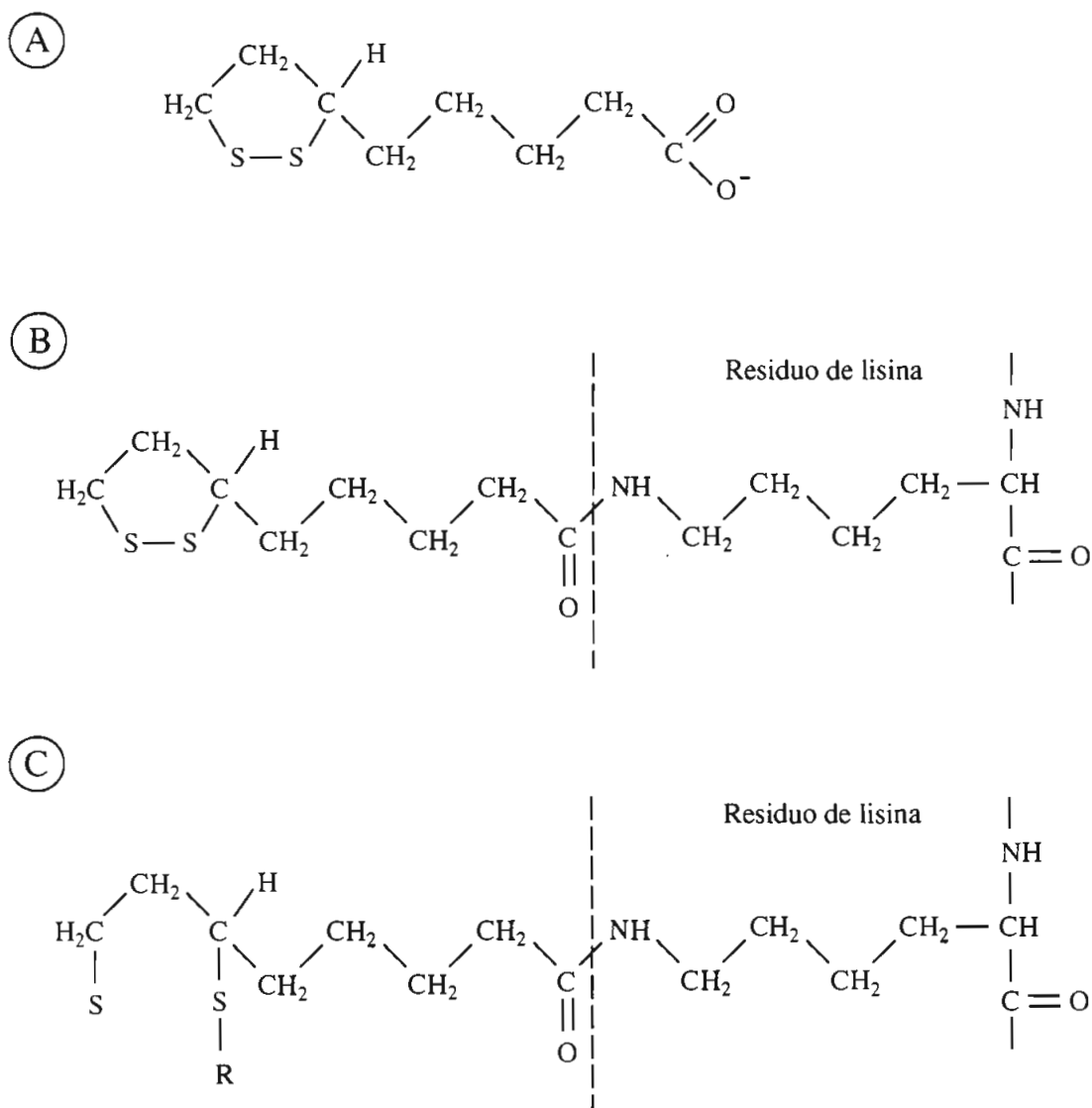
Estirpes de *E. coli* deficientes en la síntesis de GSH tienen alterada la reducción de ribonucleótidos (Fuchs y Warner, 1975). Mutantes dobles *trxB gshA* parecen usar glutarredoxina en la reducción de ribonucleótidos pese a carecer de GSH (Fuchs, 1989). El glutatión oxidado es un fuerte inhibidor de la glutarredoxina (Fuchs, 1989; Holmgren, 1979a) por lo que cambios relativamente pequeños en la relación [GSH]/[GSSG] podrían inactivar esta enzima siendo éste un importante mecanismo de control de la síntesis de desoxirribonucleótidos.

Hasta hace poco tiempo se pensó que el glutatión era una molécula ubicua. Sin embargo, la mayor parte de estos datos provenían de estudios en células animales y, en bastante menor medida, de plantas, hongos y microorganismos. En 1978 se publicó el primer trabajo donde se indicaba que determinadas bacterias no poseían GSH (Fahey *et al.*, 1978). Posteriormente se han hecho gran cantidad de estudios sobre el contenido en tioles de distintos microorganismos tanto aerobios como anaerobios. Por lo general, las bacterias Gram-positivas no poseen GSH, aunque presentan otras formas tiólicas como CoA, H<sub>2</sub>S o cisteína, así como otras formas aún no identificadas. En las bacterias Gram-negativas, el GSH es el tiol más abundante aunque también hay bacterias en este grupo que carecen de él (Newton y Fahey, 1990).

Estudiando la filogenia de las distintas especies en base a la secuencia de sus ARN ribosómicos, la producción de GSH parece asociada a aquellos procariontes que iniciaron la fotosíntesis generadora de oxígeno. Actualmente se acepta que mitocondrias y cloroplastos de células eucarióticas proceden de la endosimbiosis de procariontes ancestrales en un citoplasma eucariótico. La asociación de la biosíntesis de GSH con estos orgánulos apoya la idea de que el GSH juega un papel importante en la protección contra la toxicidad del oxígeno en eucariontes. Sin embargo, parece que el GSH ya estaba presente en determinadas bacterias fotosintéticas no oxigénicas antes de la aparición del oxígeno en la atmósfera, por lo que su presencia no puede ser explicada sólo como una protección frente a daños oxidativos. Por tanto el glutatión debería tener otra función, como por ejemplo servir como una forma de almacenamiento de cisteína (Newton y Fahey, 1990).

## 1.6. ÁCIDO LIPOICO

El ácido lipoico es un grupo prostético de amplia distribución entre los seres vivos, tanto microorganismos eucarióticos y procarióticos como en gran variedad de plantas y tejidos animales (Herbert y Guest, 1975; Reed y Hackert, 1990). En su forma funcional el grupo carboxílico del ácido lipoico se une mediante un enlace amida al grupo ε-amino de un residuo de lisina de la proteína como se muestra en la Figura 10.



**Figura 10. Estructura del ácido lipoico.** A) En su forma de lipoato. B) Forma funcional unido a proteína. C) Forma modificada del ácido lipoico unido a proteína. R es un grupo acetilo en el complejo piruvato deshidrogenasa y un grupo succinilo en la α-cetoglutarato deshidrogenasa.

La función enzimática mejor conocida del ácido lipoico es como grupo prostético en la decarboxilación oxidativa de los  $\alpha$ -cetoácidos. En *E. coli* se han purificado dos  $\alpha$ -cetoácido deshidrogenasas que han sido estudiadas en detalle: el complejo piruvato deshidrogenasa y el complejo  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa. Cada uno de estos complejos contiene múltiples copias de tres subunidades enzimáticas que incluyen una deshidrogenasa específica, una dihidrolipoamida aciltransferasa y una lipoamida deshidrogenasa común a ambos complejos enzimáticos (Nimmo, 1987). La subunidad dihidrolipoamida aciltransferasa es modificada postraduccionalmente por unión covalente de una molécula de ácido lipoico. Se piensa que el dominio lipoico dota a estas subunidades de un 'brazo articulado' que permite el movimiento de los sustratos entre los sitios activos en el complejo enzimático (ver Figura 10) (Reed y Hackert, 1990).

La biosíntesis y metabolismo del ácido lipoico aún no se conocen bien. Se han identificado dos genes en la biosíntesis del ácido lipoico en *E. coli*, denominados *lipA* y *lipB* (Vanden Boom *et al.*, 1991). La construcción de un plásmido recombinante portador de un fragmento de restricción con el locus *lip* completo ha permitido la identificación de tres proteínas con 36, 12 y 8 kDa respectivamente. La proteína de 36 kDa ha sido identificada como el producto del gen *lipA*, mientras que el producto génico de *lipB* permanece desconocido. Las dos proteínas anteriormente mencionadas de 12 y 8 kDa están codificadas por genes adyacentes a *lipA* y *lipB* respectivamente. Vandem Boom *et al.* (1991) han construido mutantes de *E. coli* deficientes en ambas proteínas y demostrado que crecen en medio mínimo sin suplementar con ácido lipoico, lo que indica que estas dos proteínas no están directamente implicadas en su síntesis. Estos mismos autores identifican una nueva proteína lipoilada de 30 kDa perteneciente al sistema de rotura de glicina demostrando que el ácido lipoico es esencial para este sistema en *E. coli*. Esta proteína lipoilada había sido ya previamente descrita en células eucarióticas (Motokawa y Kikuchi, 1969; Robinson *et al.*, 1973; Fujiwara *et al.*, 1986).

La primera relación entre el ácido lipoico y el sistema tiorredoxina-glutarredoxina lo estableció Holmgren (1979b) al demostrar que *in vitro* el sistema NADH, lipoamida deshidrogenasa y lipoamida podían sustituir al NADPH y la tiorredoxina reductasa en la reducción de la tiorredoxina. Posteriormente se demostró que este mismo sistema podía reducir, *in vitro*, la Grx (Tsang, 1981). Sin embargo, no se ha demostrado que estos procesos ocurran *in vivo*.

Fuchs *et al.* (1983) aislaron un mutante doble en *E. coli* deficiente en glutatión y tiorredoxina. Este mutante era viable por lo que estos autores decidieron comprobar si el ácido lipoico podía estar involucrado en la ruta alternativa de reducción de ribonucleótidos. Construyeron un mutante triple *lipA*, *gshA*, *trxA* que fue incapaz de crecer en medio mínimo incluso cuando éste se suplementaba con ácido lipoico o glutatión. Estos resultados sugerían la existencia de algún tipo de interacción entre el ácido lipoico y los sistemas tiorredoxina-glutarredoxina (Fuchs *et al.*, 1983). Estudios sobre la transferencia del grupo acetilo al complejo piruvato deshidrogenasa de *E. coli* sugieren que únicamente el 50% de las moléculas de ácido lipoico están acopladas a la lipoamida deshidrogenasa. La otra mitad podría tener otro aceptor de electrones distinto y podría por tanto constituir una vía alternativa de reducción tanto para la tiorredoxina como para la glutarredoxina (Frey *et al.*, 1978).

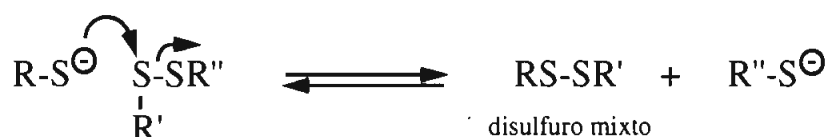
## 1.7. REACCIONES DE INTERCAMBIO TIOL/DISULFURO

Los sistemas de regulación más importantes en los seres vivos son: control de la síntesis y degradación, inhibición por productos de reacción, activación o inhibición alostérica por moléculas efectoras y modificación covalente (Ondarza, 1989). Dentro de este último se engloban procesos de fosforilación y desfosforilación, metilación, adenilación o uridilación, carboxilación, ADP-ribosilación e **intercambio tiol/disulfuro**. Los procesos de intercambio tiol/disulfuro son de gran importancia ya que en las células coexisten tioles y disulfuros de alto y bajo peso molecular. Estos procesos, que conllevan la rotura y formación de enlaces covalentes muy estables a temperatura ambiente y en medio acuoso, implican tres etapas perfectamente reversibles:

a) Ionización del grupo tiol



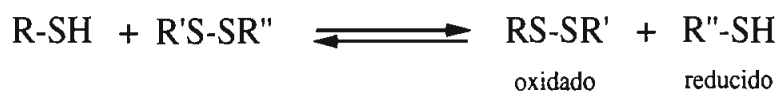
b) Ataque nucleofílico del tiolato resultante sobre uno de los átomos de azufre del disulfuro que provoca la liberación de un nuevo grupo tiolato:



c) Protonación del nuevo tiolato producido.



El resultado del proceso es la transferencia de  $1\text{ e}^{-}$  y  $1\text{ H}^{+}$  desde un átomo de azufre a otro.



La posición del equilibrio vendrá determinada por la proporción de las concentraciones relativas del ditiol y del disulfuro y la naturaleza de los residuos R, R' y R'' (Houk y Whitesides, 1987). En el presente trabajo nos interesan las reacciones de intercambio tiol/disulfuro en las que al menos uno de los componentes es una proteína (Freedman, 1979)



El tiol más abundante en las células es el glutatión, el cual por su importancia y por ser reductor de una de las proteínas estudiadas en el presente trabajo se ha descrito en el apartado I.5.

### I.7.1. Papel fisiológico del intercambio tiol/disulfuro

En principio, toda enzima o proteína con un grupo tiol (que puede ser esencial para su estructura o actividad biológica) es capaz de formar disulfuros mixtos o disulfuros intramoleculares al reaccionar con disulfuros de bajo peso molecular. El alcance de este proceso, que puede afectar a su actividad, depende del potencial redox de la proteína, la naturaleza de tales disulfuros y del microambiente que rodea a los tioles proteínicos accesibles.

Tanto en sistemas procarióticos como eucarióticos existen evidencias de múltiples procesos regulados por intercambio tiol/disulfuro. Una revisión detallada de los mismos ha sido realizada por Ziegler (1985). De forma resumida estos procesos son: plegamiento y degradación de proteínas, regulación de la expresión génica, regulación de actividades enzimáticas en animales o vegetales, receptores celulares, transporte celular, agregación plaquetaria, polimerización de microtúbulos, proliferación de linfocitos, coagulación sanguínea y fagocitosis.

### I.7.2. Enzimología del intercambio tiol/disulfuro

Las reacciones de intercambio tiol/disulfuro se llevan a cabo de forma espontánea pero también están catalizadas enzimáticamente. La lipoamida deshidrogenasa, glutatión reductasa y tioredoxina reductasa constituyen los tres únicos sistemas enzimáticos capaces de catalizar la reducción de disulfuros a expensas del poder reductor generado por el metabolismo celular en forma de piridín nucleótidos. Las reacciones catalizadas por la glutatión reductasa y tioredoxina aportan la mayor parte de la capacidad reductora de disulfuros en tejidos animales (Holmgren, 1980). El glutatión reducido puede reducir a una gran variedad de disulfuros:



La glutarredoxina cataliza reacciones de este tipo usando GSH como reductor. El conjunto constituido por NADPH, glutatión reductasa, GSH y glutarredoxina se le denomina sistema glutarredoxina. De forma similar, el sistema tiorredoxina está constituido por NADPH, tiorredoxina reductasa y tiorredoxina.

### *Tiorredoxina y glutarredoxina como tioltransferasas*

Tanto el sistema tiorredoxina como el sistema glutarredoxina constituyen una fuente muy importante de reducción de disulfuros celulares (Holmgren, 1985). Las funciones de la tiorredoxina como donador de electrones vistas en el apartado I.1.1. pág. 5 implican la reducción de un puente disulfuro activo específico. Sin embargo, la tiorredoxina también actúa como una proteína disulfuro reductasa inespecífica (Moore *et al.*, 1964), siendo la reducción de la insulina la utilizada como sistema modelo en el estudio de esta reacción (Holmgren 1979b; c). La insulina tiene tres puentes disulfuro y la reducción de los dos puentes intercatenarios provoca la inactivación de la hormona.

El par  $\text{Trx-S}_2/\text{Trx-(SH)}_2$  tiene un potencial redox de -0,26 voltios a pH 7,0, suficiente para reducir la mayoría de los disulfuros proteínicos (Gleason y Holmgren, 1988). La Figura 11 muestra un esquema del mecanismo propuesto para la actividad proteína disulfuro reductasa de la tiorredoxina, basado en la formación de un disulfuro mixto entre la tiorredoxina y la proteína previo a la oxidación de la Trx y la formación de dos grupos tioles en la proteína. Aparte de la insulina, la tiorredoxina es capaz de reducir disulfuros de muchas proteínas, como gonadotropina coriónica humana (Holmgren y Morgan, 1976), fibrinógeno (Blombäck *et al.*, 1974), factores de coagulación de la sangre (Savidge *et al.*, 1979) etc., aunque no todos los disulfuros proteínicos son reducidos con idéntica eficacia dado que parece existir cierta especificidad hacia alguno de ellos (Holmgren, 1985). La actividad disulfuro reductasa de la tiorredoxina es un proceso reversible donde el equilibrio está determinado por la concentración y potenciales redox de los tioles y disulfuros implicados en la reacción. La tiorredoxina es capaz de transferir equivalentes de reducción desde una proteína reducida hasta el  $\text{NADP}^+$  vía tiorredoxina reductasa. Este último proceso es de primordial interés para la formación de disulfuros en proteínas recién sintetizadas.

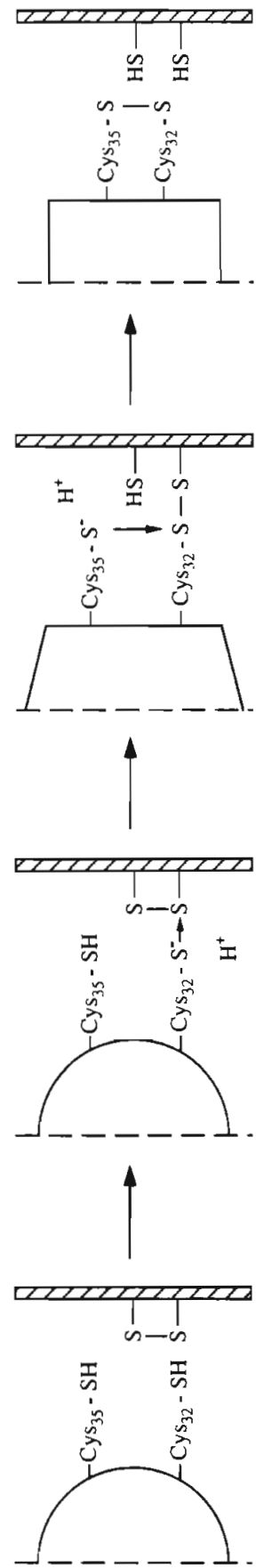
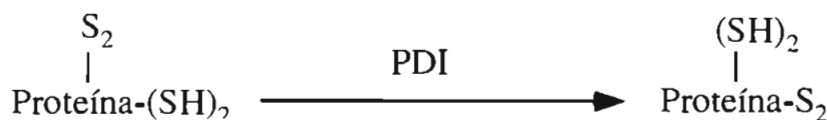


Figura 11. Mecanismo de acción de la tiorredoxina en la reducción de disulfuros proteínicos.

En eucariontes se ha aislado y clonado el gen que codifica la proteína disulfuro isomerasa (PDI) que cataliza el reordenamiento intramolecular de disulfuros y ditiolos durante el plegamiento proteínico según el esquema siguiente (Hilson *et al.*, 1984; Edman *et al.*, 1985):



La PDI posee dos regiones de unos 100 aminoácidos que son homólogas a la tiorredoxina de *E. coli*. Cada una de ellas contiene un sitio activo Trp-Cys-Gly-His-Cys-Lys sugiriendo que la PDI cataliza el intercambio de disulfuros por un mecanismo idéntico al de la tiorredoxina (Gleason y Holmgren, 1988).

La glutarredoxina también cataliza la reducción dependiente de glutatión de compuestos pequeños que contienen grupos disulfuro tales como HED. Por tanto se comporta como una transhidrogenasa. Sin embargo, se diferencia de la tiorredoxina en que no es capaz de realizar esto mismo en proteínas de mayor peso molecular, es decir, no se comporta como una proteína disulfuro reductasa (Gleason y Holmgren, 1988).

Mannervik *et al.* (1983) han estudiado la contribución relativa de los sistemas Trx y Grx a la reducción de disulfuros de alto y bajo peso molecular, usando anticuerpos para bloquear ambos sistemas (anti-GRasa y anti-Trx). El sistema Grx eficientemente reduce disulfuros de bajo peso molecular, como cistina, cistamina, homocisteína etc. Sin embargo, para polipéptidos como la insulina es más eficiente el sistema Trx.

### 1.8. ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS

Tiorredoxina y glutarredoxina se aislaron inicialmente como proteínas donadoras de electrones para la ribonucleótido reductasa (Thelander y Reichard, 1979), enzima esencial para la síntesis *de novo* de desoxirribonucleótidos a partir de sus correspondientes ribonucleótidos. Los desoxirribonucleótidos son un prerrequisito para la síntesis y reparación del ADN, estando su síntesis finamente regulada por mecanismos alostéricos (Thelander y Reichard, 1979). Dado que Trx y Grx eran (al inicio de este trabajo) los dos únicos donadores de electrones conocidos de la ribonucleótido reductasa, la deficiencia en una o ambas proteínas podría conferir a las células una sensibilidad a agentes que dañan la molécula de ADN. En efecto, la supervivencia celular frente a estos agentes podría requerir la replicación y/o reparación del ADN, cuya síntesis estaría disminuida en ausencia de dichas proteínas.

En este sentido, uno de los objetivos del presente trabajo ha sido analizar la sensibilidad de estirpes bacterianas deficientes en estas proteínas a un grupo escogido de agentes letales y mutagénicos (Pueyo y Ruiz-Rubio, 1984).

#### 1.8.1. Ensayo de resistencia a la L-arabinosa

El ensayo de mutagénesis utilizado en el presente trabajo es el denominado ensayo Ara o de resistencia a L-arabinosa. Este ensayo, descrito inicialmente en *Salmonella typhimurium* por Ruiz-Vázquez *et al.* (1978) ha sido ampliamente mejorado, validado y caracterizado por el grupo de la Dra. Carmen Pueyo (Pueyo, 1978; Pueyo y López-Barea, 1979; Pueyo y Ruiz-Rubio, 1984, entre otros).

La transformación catabólica de la L-arabinosa en D-xilulosa-5-fosfato está controlada en bacterias por el operón *araBAD* (Figura 12). Los tres genes estructurales, *araB*, *araA*, y *araD* codifican las enzimas L-ribuloquinasa, L-arabinosa isomerasa y L-ribulosa-5-fosfato-4-epimerasa, respectivamente. Estos tres genes, junto con los elementos de control *araO* y *araI* (operador e iniciador) constituyen una unidad de transcripción regulada por la proteína codificada por el gen *araC*.

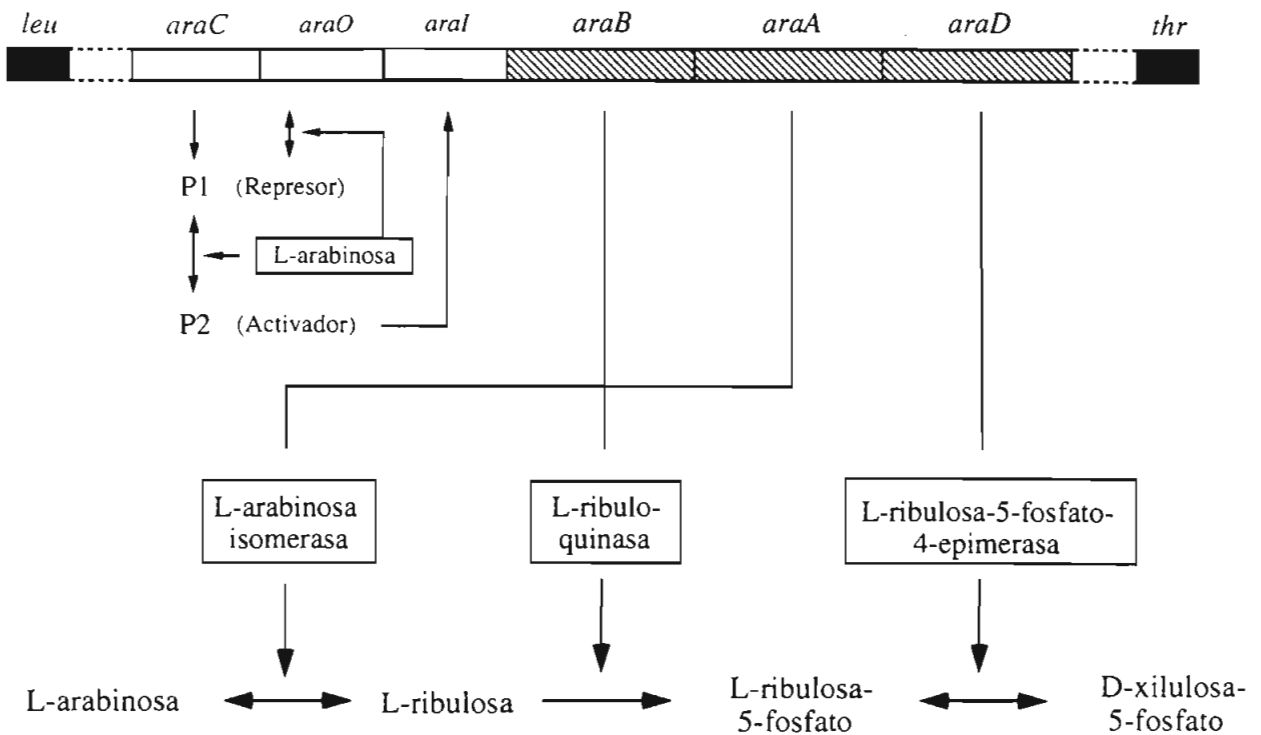


Figura 12. Operón *araBAD* con los sitios de control y el gen regulador *araC*.

La proteína reguladora se produce en presencia de *L*-arabinosa e induce la expresión del operón; la ausencia de la misma lo reprime. Además, el operón *araBAD* está controlado de forma positiva por el complejo que forma la proteína CAP y el AMPc, por lo que no se expresa en presencia de glucosa (Englesberg y Wilcox, 1974).

Las mutaciones en el gen *araD* confieren un doble fenotipo: (i) fenotipo *Ara*<sup>-</sup> porque las bacterias no pueden utilizar *L*-arabinosa como única fuente de carbono y energía, y (ii) fenotipo *Ara*<sup>S</sup> ya que la *L*-arabinosa inhibe el crecimiento de los mutantes *araD* en presencia de otra fuente de carbono y energía (siempre que ésta no reprima la expresión del operón *araBAD*, como es el caso del glicerol). El efecto bacteriostático que la *L*-arabinosa ejerce sobre los mutantes *araD* se ha explicado por la acumulación de *L*-ribulosa-5-fosfato, el sustrato de la reacción catalizada por la enzima *L*-ribulosa-5-fosfato-4-epimerasa (producto del gen *araD*) (Englesberg *et al.*, 1962).

El ensayo Ara utiliza una estirpe *araD*<sup>-</sup> a partir de la cual selecciona mutantes resistentes a L-arabinosa (fenotipo Ara<sup>r</sup>) en un medio con L-arabinosa y glicerol. Menos del 2% de tales mutantes son verdaderos revertientes en el gen *araD* que han recuperado la actividad L-ribulosa-5-fosfato-4-epimerasa. La mayoría, más del 98%, son dobles mutantes que, manteniendo la mutación en el gen *araD*, adquieren una segunda mutación en los genes *araA*, *araB* o *araC*. Tanto las reversiones en el gen *araD* como las mutaciones directas en los genes *araA*, *araB* o *araC*, evitarían la acumulación del metabolito supuestamente tóxico (Pueyo y López-Barea, 1979).

Abril (1988) adaptó el ensayo Ara a la bacteria *Escherichia coli*, aislando una mutación en el gen *araD* del operón denominada *araD81*. Dicha mutación confiere en *E. coli* un fenotipo y características similares a la mutación equivalente *araD* del ensayo Ara en *S. typhimurium*. La mutación *araD* se combinó con una deficiencia en el sistema fiel de reparación por escisión  $\Delta(uvrB-bio)$  y con el plásmido pKM101 (portador de los genes *mucAB*) en la estirpe UC1101 (Abril y Pueyo, 1990), dado que ambas características genéticas aumentan la sensibilidad de las bacterias a la acción mutagénica de los agentes que dañan el ADN. La estirpe UC1101 (*araD81*,  $\Delta(uvrB-bio)$  y pKM101) (Abril y Pueyo, 1990) ha sido utilizada como parental de todas las estirpes construidas en el presente trabajo.

## I.9. EL SISTEMA SOS Y EL PLÁSMIDO *pKM101*

### I.9.1. El sistema SOS

La exposición celular a agentes o condiciones que dañan el ADN o interfieren en su replicación provoca, tanto en *E. coli* como en *S. typhimurium*, los siguientes efectos: aumento de la capacidad de reparación del ADN, incremento en la mutagénesis, crecimiento filamentoso, cese de la respiración, degradación de ADN, inducción de la replicación cromosómica e inducción de fagos lisogénicos. Este conjunto de efectos fisiológicos recibe el nombre de **respuesta SOS**. Dicha respuesta conlleva la inducción coordinada de la expresión de unos 20 genes (Walker, 1984).

El modelo vigente de la regulación de la respuesta SOS (Witkin, 1976; Walker, 1984) sugiere que la presencia de lesiones en el ADN inicia una cascada de sucesos que culmina con la expresión de los genes que forman parte del sistema SOS. De esta forma, la respuesta SOS aumenta la supervivencia celular induciendo la reparación fiel por escisión (*uvrA*, *uvrB* y *uvrC*), la recombinación (*recA*, *recN*, *recQ*), un mecanismo que introduce mutaciones (*umuDC*, *recA*) y otro que inhibe la división celular (*sfiA*) (Echols y Goodman, 1991).

### I.9.2. Mutagénesis asociada al sistema SOS

La mutagénesis dependiente del sistema SOS es uno de los procesos celulares inducidos por la desrepresión del regulón SOS (Witkin, 1976). Aunque la base molecular de este proceso aún no ha sido aclarada los modelos actuales proponen una relajación de la fidelidad de la ADN polimerasa durante la inducción de la respuesta SOS. Dicha relajación permitiría que la cadena dañada actuase como molde, introduciéndose mutaciones mediante la inserción de nucleótidos incorrectos (Bridges y Woodgate, 1985; Echols y Goodman, 1990).

Kato y Shinura (1977) y Steinborn (1978) aislaron, independientemente, mutantes de *E. coli* inmutables por luz UV o 4NQO, pero en los que se inducía eficientemente el resto de las funciones del sistema SOS. El locus responsable de este fenotipo se localizó en el minuto 25 del mapa genético de *E. coli* y recibió el nombre de *umuC* (por UV mutagenesis). Posteriormente, se identificó el producto de dicho gen y se comprobó que las mutaciones previamente obtenidas afectaban a



dos genes adyacentes pero diferentes: *umuD* y *umuC* (Elledge y Walker, 1983). Aunque el mecanismo de acción de las proteínas codificadas por estos genes no está claro parece ser que UmuC y UmuD forman un complejo, junto con la proteína RecA facilitando la replicación de la región donde se localiza la lesión (Woodgate *et al.*, 1989).

### I.8.3. El plásmido pKM101

El plásmido pKM101 incrementa la sensibilidad a la mutagénesis dependiente de SOS, al favorecer la replicación errónea del ADN en el sitio donde se ha producido una lesión. Este plásmido deriva de R46 que pertenece al grupo N de incompatibilidad y que fue aislado por Mortelmans y Stocker (1979). Se obtuvo mediante la delección de una región de 14 kb que incluye entre otros genes los de resistencia a varios antibióticos (Langer *et al.*, 1981).

Entre los genes que codifica pKM101 están *mucA* y *mucB* que son funcionalmente equivalentes a los genes *umuDC*. Los genes *mucAB*, que se organizan en un operón, suprimen el fenotipo de los mutantes *umuDC* de *E. coli* (Walker y Dobson, 1979). Aunque *umuDC* y *mucAB* tienen tamaños similares, ambos operones han experimentado una considerable divergencia evolutiva al presentar las proteínas codificadas por ellos sólo un 35% de homología en su secuencia de aminoácidos (Walker, 1984).

Desde una perspectiva biológica, la mayor tasa de mutaciones puntuales que se observa tras la inducción del sistema SOS puede tener dos significados (Echols y Goodman, 1990; 1991) no necesariamente excluyentes: i) se trata de un mecanismo de **supervivencia celular** donde las mutaciones serían un efecto colateral y ii) constituye un mecanismo de **supervivencia de la población** que potencia la variabilidad genética, incrementando de este modo la probabilidad de que surja una variante adaptada al estrés medioambiental.

### ***1.10. OBJETIVOS***

- a) Aislar y caracterizar estirpes de *Escherichia coli* deficientes en distintos componentes de los sistemas tiorredoxina y glutarredoxina.
- b) Estudiar la respuesta mutagénica frente a distintos agentes genotóxicos.
- c) Evaluar el papel de tiorredoxina y glutarredoxina en la reducción de ribonucleótidos y en el mantenimiento del estado redox del glutatión.
- d) Investigar la posible existencia de donadores de electrones alternativos a tiorredoxina y glutarredoxina en la reducción de ribonucleótidos.

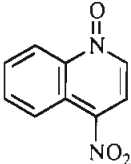
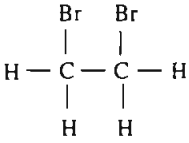
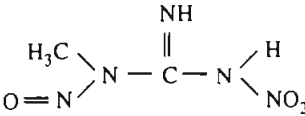
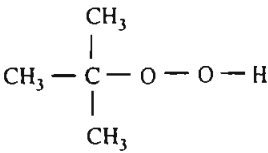
## ***II. MATERIALES Y MÉTODOS***

## II.1. COMPUESTOS QUÍMICOS

El nombre, abreviatura, peso molecular y fórmula de los compuestos mutagénicos ensayados en el presente trabajo se recogen en la Tabla 1.

La 4NQO y *t*-butil-OOH fueron suministrados por Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, USA. El EMS y MNNG se obtuvieron de Aldrich-Chemie, Steinheim, Germany. El DBE se adquirió en Fluka Chemie AG, Industriestrasse 25, Buchs, Switzerland. Todos los mutágenos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) proporcionado por Merck, Darmstadt, Germany, excepto *t*-butil-OOH que se disolvió en agua destilada estéril.

**Tabla 1. Compuestos mutagénicos ensayados.**

Nombre	Abreviatura	Peso molecular	Fórmula
4-Nitroquinolina- <i>N</i> -óxido	4NQO	190,20	
1,2-Dibromoetano	DBE	187,88	
<i>N</i> -metil- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina	MNNG	147,10	
Etilmetanosulfonato	EMS	124,16	$\text{CH}_3-\text{SO}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
Hidroperóxido de <i>ter</i> butilo	<i>t</i> -butil-OOH	90,12	

## II.2. ESTIRPES BACTERIANAS

## II.2.1. Características genéticas

La Tabla 2 resume el nombre, genotipo y origen de las estirpes construidas por otros autores y usadas en el presente trabajo. La Tabla 3 indica el nombre, genotipo y construcción de las estirpes aisladas en el presente trabajo. Las características genéticas de los plásmidos utilizados se indican en la Tabla 4.

Tabla 2. Estirpes bacterianas patrones.

Estirpe	Genotipo	Referencia
UC1101	<i>araD81, nad113, arg56, Δ(uvrB-bio), pKM101</i>	Abril y Pueyo, 1990
UC5710	como UC1101, pero <i>pKM101</i> <sup>-</sup>	Abril <i>et al.</i> , 1992
K38	<i>HfrC, tonA22, garB10, ompF, relA1, pit10, spoT1, T2<sup>r</sup>, phoA6, λ</i>	Russel y Model, 1985b
A307	K38 <i>ΔtrxA</i>	Russel y Model, 1986
A407	K38 <i>grx::kan, zbi::Tn10,</i>	Russel y Holmgren, 1988
A410	K38 <i>grx::kan, zbi::Tn10, ΔtrxA</i>	Russel y Holmgren, 1988
JRG26	<i>lip2, supE42, λ<sup>-</sup></i>	Herbert y Guest, 1968
SK2255	<i>zbe279::Tn10, thyA6, rpsL120, deoC1</i>	CGSC#6421
K732	<i>pro3, entA403, his218, ilvC7, metB1, xyl, λ<sup>-</sup>, metE163::Tn10, de6(Δlac), rpsL107, supE44</i>	CGSC#6403
UC1105	como UC1101, pero <i>gshA</i> <sup>-</sup>	Abril <i>et al.</i> , 1989
UC299	como UC1101, <i>ada<sup>-</sup> ogt<sup>-</sup></i>	Abril, 1988
A397	K38 <i>gshA::Tn10kan, ΔtrxA</i>	Russel <i>et al.</i> , 1990

Tabla 3. Estirpes bacterianas aisladas en el presente trabajo.

Estirpe	Genotipo relevante	Construcción
UC596	como A307 pero <i>metE163::Tn10</i>	P1(K732) x A307
UC513	como UC1101 pero $\Delta$ <i>trxA</i> , <i>metE163::Tn10</i>	P1(UC596) x UC1101
UC518	como UC513 pero <i>met</i> <sup>+</sup>	espontáneo
UC525	como UC1101 pero <i>grx::kan</i>	P1(A407) x UC1101
UC646	como UC518 pero <i>grx::kan</i> , <i>zbi::Tn10</i>	P1(A407) x UC518
UC647	como UC646 pero capaz de crecer en medio mínimo	espontáneo
UC844	como UC518 pero pKM101 <sup>-</sup>	espontáneo
UC848	como UC525 pero pKM101 <sup>-</sup>	espontáneo
UC946	como UC646 pero pKM101 <sup>-</sup>	espontáneo
UC827	como UC647 pero pKM101 <sup>-</sup>	espontáneo
UC871	como UC5710 pero pBR322	transformación
UC872	como UC5710 pero pBHK8	transformación
UC873	como UC5710 pero pBR322ECG	transformación
UC876	como UC5710 pero pAL7	transformación
UC928	como UC827 pero pBR322	transformación
UC919	como UC827 pero pBHK8	transformación
UC929	como UC827 pero pBR322ECG	transformación
UC937	como UC827 pero pAL7	transformación
UC858	como UC5710 pero <i>gshA::Tn10kan</i>	P1(A397) x UC5710
UC859	como UC844 pero <i>gshA::Tn10kan</i>	P1(A397) x UC844
UC952	como UC858 pero <i>grx::kan</i> , <i>zbi::Tn10</i>	P1(A407) x UC858 selección de Tet <sup>r</sup> y cotransducción con Kan <sup>r</sup> (a)
UC842	como JRG26 pero <i>zbe279::Tn10</i>	P1(SK2255) x JRG26
UC938	como UC5710 pero <i>lip2</i> , <i>zbe279::Tn10</i>	P1(UC842) x UC5710
UC939	como UC844 pero <i>lip2</i> , <i>zbe279::Tn10</i>	P1(UC842) x UC844
UC941	como UC848 pero <i>lip2</i> , <i>zbe279::Tn10</i>	P1(UC842) x UC848
UC954	como UC859 pero <i>lip2</i> , <i>zbe279::Tn10</i>	P1(UC842) x UC859
UC956	como UC859 pero <i>grx::kan</i> , <i>zbi::Tn10</i>	P1(A407) x UC859 selección de Tet <sup>r</sup> y cotransducción con Kan <sup>r</sup> (a)

<sup>a</sup> Dado que la estirpe receptora era Kan<sup>r</sup>, la cotransducción Tet<sup>r</sup> Kan<sup>r</sup> se comprobó mediante una segunda transducción utilizando como donadora la estirpe construida y como receptora un tipo silvestre Tet<sup>s</sup> Kan<sup>s</sup>.

Tabla 4. Plásmidos.

Plásmido	Descripción	Referencia
pKM101	plásmido de 34,5 kb portador los genes <i>mucAB</i> implicados en la reparación SOS propensa a error.	Walker, 1978
pBR322	plásmido de 4,36 kb con genes de resistencia a tetraciclina y ampicilina, usado comúnmente como vector de clonación.	Bolivar <i>et al.</i> , 1977
pBHK8	como pBR325 pero con un fragmento de 3 kb que porta el gen <i>trxA</i> .	Wallace y Kushner, 1984
pBR322ECG	como pBR322 pero con un fragmento de 1 kb que porta el gen <i>grx</i> .	Höög <i>et al.</i> , 1986
pAL7	plásmido de 8,0 kb con un fragmento de 5,7 kb que porta el operón completo de la ribonucleótido reductasa ( <i>nrdAB</i> ).	Larsson y Sjöberg, 1986

### II.2.2. Conservación de las estirpes

Las estirpes bacterianas utilizadas se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en viales de plástico que contenían 1 ml de cultivo estacionario (crecido en medio rico LB) y glicerol al 15%. Cada vez que se necesitaron colonias se aislaron a partir de estos viales en cajas de LB con ampicilina, tetraciclina o kanamicina según la estirpe portara los plásmidos pKM101, pBR322 o derivados, el transposón Tn10 o el casete de resistencia a kanamicina. Las cajas se conservaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante un periodo máximo de un mes y se utilizaron para aislar colonias frescas (de 24 h) a partir de las cuales se obtuvieron los cultivos empleados en los distintos experimentos. Dicho procedimiento tuvo por objeto evitar los problemas que pudieran surgir de la apertura frecuente de los cultivos congelados (Maron y Ames, 1983).

### II.2.3. Crecimiento de las bacterias

#### *Ensayos de mutagénesis*

Los ensayos de mutagénesis se llevaron a cabo con cultivos bacterianos en fase estacionaria de crecimiento. Estos cultivos se obtuvieron por inoculación de una colonia fresca en 10 ml de medio LB (contenidos en un matraz de 100 ml) e incubación de 12 a 16 h (según la estirpe bacteriana) a 37°C y 90 rpm.

#### *Ensayos bioquímicos*

Los ensayos bioquímicos se llevaron a cabo con cultivos bacterianos en fase logarítmica de crecimiento. Estos cultivos se obtuvieron reinoculando las bacterias de un cultivo estacionario en medio LB sin suplementar o suplementado con ampicilina, kanamicina (50µg/ml) o tetraciclina (20µg/ml). Los cultivos con una DO<sub>600</sub> inicial de 0,05 se incubaron con agitación a 37°C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> entre 0,5 y 0,7.

#### *Curvas de crecimiento*

10 ml de medio rico LB o medio mínimo sin suplementar o suplementado con metionina o cistina, en tubos de cristal de 150 x 20 mm, se inocularon con 0,05 ml de un cultivo estacionario, previamente centrifugado y resuspendido en solución salina VB. Los tubos se colocaron en una gradilla metálica con una inclinación de 45° y una agitación de 150 rpm y se incubaron a 37°C en un incubador orbital (modelo Certomat R. Braun Biotech.). El crecimiento se cuantificó midiendo la DO a 600 nm y se tomaron medidas cada 30 min hasta alcanzar la fase estacionaria. El tiempo de generación se calculó como la pendiente de la porción lineal de la fase de crecimiento logarítmico.

### II.2.4. Comprobación del fenotipo de las estirpes

Una alícuota de 0,1 ml de cultivo estacionario se sembró en una caja de LB, parte de la cual se irradió con luz ultravioleta durante 20 segundos. En la parte no irradiada se depositaron gotas de 0,01 ml de una solución 0,8% de ampicilina, 0,8% de kanamicina y/o 0,4% de tetraciclina. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h.



La delección  $\Delta uvrB$  confiere sensibilidad a la luz ultravioleta por deficiencia en el sistema fiel de reparación por escisión. Los plásmidos pKM101, pBR322 y derivados confieren resistencia a ampicilina; el transposón Tn10 y el plásmido pBR322 confieren resistencia a tetraciclina y el transposón inserto en el gen *gshA* y el casete inserto en el gen *grx* confieren resistencia a kanamicina. En distintos casos, según la estirpe empleada, se comprobó la capacidad de crecer en medio mínimo con o sin suplementar con determinados requerimientos.

### **II.3. PROTOCOLOS**

#### **II.3.1. Eliminación del plásmido pKM101**

La pérdida espontánea de pKM101 se favoreció acelerando el crecimiento del cultivo para tratar de desincronizar la replicación del plásmido con la del cromosoma bacteriano. Para ello, el cultivo se incubó a 37°C con agitación rápida (250–300 rpm). Una vez que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento, se diluyó en solución salina VB y se sembraron aproximadamente 1.000 bacterias en cajas de medio nutritivo LB para obtener colonias aisladas. Dichas colonias se replicaron en cajas de LB con y sin ampicilina, para seleccionar aquellos clones que habían perdido el plásmido.

#### **II.3.2. Ensayos de mutagénesis**

Los ensayos de mutagénesis se llevaron a cabo usando bacterias en fase estacionaria de crecimiento centrifugadas (2.000 x g durante 20 min) y resuspendidas en solución salina VB. En todos los casos se sembraron al menos dos cajas selectivas de mutantes Ara<sup>r</sup> por dosis de mutágeno. Dichas cajas se incubaron durante tres días a 37°C. El número de mutantes inducidos se obtuvo restando del número de mutantes totales los mutantes espontáneos. El número de bacterias viables se determinó sembrando diluciones adecuadas en cajas de medio nutritivo LB e incubándolas 24 h.

##### ***Ensayos en cajas selectivas***

El ensayo de mutagénesis en cajas selectivas se utilizó con los compuestos MNNG y 4NQO. A 2 ml de agar de cobertera suplementado con 0,5 mg de glucosa, en tubos de 10 x 100 mm, se les añadió por orden: 0,1 ml de bacterias en medio VB (~ 10<sup>7</sup> viables) y 0,03 ml de la solución del mutágeno a ensayar. En los controles los 0,03 ml del compuesto se sustituyeron por 0,03 ml del disolvente. El contenido de cada tubo se vertió en cajas de medio mínimo selectivo para mutantes Ara<sup>r</sup>.

### *Ensayos con preincubación*

Mediante este protocolo se ensayaron los compuestos DBE, *t*-butil-OOH y EMS. A tubos de 10 x 100 mm se les añadió: 0,1 ml de bacterias en medio VB ( $\sim 10^8$  viables), 0,03 ml de la solución de mutágeno (o disolvente) y 0,87 ml de solución salina VB suplementada con 5 mg de glucosa. Los tubos se cerraron, se protegieron de la luz y se incubaron durante 20 min a 37°C con agitación orbital. Transcurrido este tiempo, alícuotas de 0,1 ml se añadieron a tubos de 10 x 100 mm con 2 ml de agar de cobertera sin glucosa, vertiéndose el contenido en cajas de medio mínimo selectivo.

### *Mutagénesis con luz UV*

8 ml de una suspensión bacteriana en solución salina VB ( $3-5 \times 10^8$  viables/ml) se trataron con luz ultravioleta ( $0,02 \text{ J/m}^2 \times \text{s}$ ) durante diferentes tiempos. En el caso de la dosis cero la suspensión bacteriana no se irradió. Tras la exposición se tomaron alícuotas de 0,1 ml que se añadieron a tubos de 10 x 100 mm con 2 ml de agar de cobertera suplementado con 0,5 mg de glucosa y se sembraron en cajas de medio mínimo selectivo.

### **II.3.3. Transferencia de genes mediante transducción con el fago P1<sub>vir</sub>**

#### *Preparación de lisados y titulación*

La preparación de lisados del fago P1<sub>vir</sub> y su titulación se llevaron a cabo según Blanco (1976). 0,2 ml de un cultivo estacionario de la estirpe donadora se inoculó en 10 ml de LB, incubándose a 37°C y 120 rpm hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  de 0,35. A continuación se añadió 0,1 ml de 500 mM  $\text{CaCl}_2$  y se incubó durante 10 min. En un tubo de 10 x 100 mm se mezcló 0,25 ml de este cultivo bacteriano con 0,1 ml de una suspensión del fago, convenientemente diluido en LB con 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$  para tener una multiplicidad de infección entre  $0,5-1 \times 10^6$  PFU/ml, incubándose durante 25 min sin agitación. Tras la incubación se añadieron 3 ml de agar de cobertera y se vertió en una caja de LA10 recién hecha. Las cajas se incubaron a 37°C durante una noche, boca arriba y en un ambiente húmedo. La capa de agar de cobertera se trituró junto con unas gotas de cloroformo centrifugándose a continuación a  $2.000 \times g$  durante 20 min. El sobrenadante con

los fagos se guardó, con unas gotas de cloroformo, a 4°C.

Para titular el lisado, se inocularon 0,5 ml de cultivo en fase estacionaria en 10 ml de LB y se incubó a 37°C y 120 rpm hasta una  $DO_{600}$  de 0,7. Seguidamente se añadieron 0,2 ml de 500 mM  $CaCl_2$  y se continuó incubando durante otros 10 min. 0,25 ml de esta suspensión bacteriana se mezcló con 0,1 ml de la solución de fagos convenientemente diluida en LB con 2,5 mM  $CaCl_2$ . Las mezclas se incubaron 25 min a 37°C sin agitación, tras lo cual se añadieron 3 ml de agar de cobertera por tubo y se sembró el contenido de cada tubo en una caja de LA10 recién hecha. Las cajas se incubaron a 37°C durante una noche, boca arriba y en un ambiente húmedo. Al día siguiente se contaron los halos de lisis.

La preparación y titulación de lisados del fago T7 para comprobar la deficiencia en tiorredoxina se realizó de la misma forma que para el fago P1vir.

### ***Transducción con el fago P1vir***

La transducción se llevó a cabo según Blanco (1976). Un cultivo de la estirpe receptora (0,2 ml en 10 ml de LB fresco) se recreció a 37°C y 120 rpm, hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,45 ( $\sim 2 \times 10^8$  viables/ml). A continuación se añadió 0,1 ml de 500 mM  $CaCl_2$  y se incubó durante 15 min. Tras la incubación se mezcló 0,5 ml de esta suspensión bacteriana con 0,1 ml del fago convenientemente diluido en LB con 2,5 mM  $CaCl_2$  incubándose a 37°C sin agitación durante 25 min. La transducción se detuvo añadiendo 0,1 ml 200 mM de citrato sódico (quelante de  $Ca^{++}$ ). Las mezclas se sembraron en cajas de LB suplementadas con el antibiótico correspondiente.

## **II.3.4. Transferencia de plásmidos por transformación**

### ***Aislamiento de plásmidos***

Los plásmidos se aislaron de las bacterias portadoras mediante el kit “Magic™ Minipreps DNA Purification System” comercializado por Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

### *Preparación de bacterias competentes*

Las bacterias competentes se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Hanahan (1985). Una colonia se inoculó en 2 ml de medio nutritivo SOB y se agitó en un matraz de 125 ml a 300 rpm y 37°C durante 2 h. Posteriormente se añadió todo el volumen a 50 ml de SOB, agitándose a 37°C hasta alcanzar una  $DO_{550}$  de ~0,5. Las células se centrifugaron a 1.000 x g durante 10 min, se secaron, se resuspendieron en 15 ml de solución RFI y se incubaron en hielo picado durante 2 h. Transcurrido este tiempo se volvieron a centrifugar a 1.000 x g durante 10 min a 4°C. Finalmente las células se resuspendieron en 2 ml de solución RFII, se agitaron suavemente y se repartieron en alícuotas de 0,2 ml, almacenándose en tubos eppendorf a -80°C.

### *Transformación con ADN de plásmido*

Las células competentes se transformaron siguiendo el protocolo descrito por Hanahan (1985). A un tubo eppendorf con 0,03 ml de células competentes se añadieron de 1 a 5 µl de la solución de plásmido (para obtener ~1000 transformantes/placa), incubándose en hielo picado durante 30 min. Tras este período se calentaron a 37°C durante 2 min y se volvieron a enfriar en hielo picado durante 5 min. Seguidamente se añadió 0,24 ml de medio nutritivo SOB y se incubó con agitación a 37°C durante 90 min. Finalmente el contenido del tubo eppendorf se sembró en una caja de LB con ampicilina y se incubó durante 24 h.

## II.3.5. Actividades enzimáticas

### *Obtención de extractos libres de células*

Cultivos bacterianos en fase logarítmica de crecimiento se centrifugaron a 15.000 x g durante 20 min. El precipitado se resuspendió en tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) con 1 mM EDTA (4 ml/g). Las células se rompieron a 4°C mediante ultrasonidos usando un sonicador (Sonifier Cell Disruptor B-30, Branson Sonic Power) a máxima intensidad. La ruptura se realizó durante 3 períodos de 20 segundos, con interrupciones del mismo tiempo para evitar el calentamiento de la muestra. Todos los procesos siguientes se realizaron a 4°C.

### *Actividad ribonucleótido reductasa*

El extracto libre de células se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min y el sobrenadante se utilizó inmediatamente para determinar la actividad ribonucleótido reductasa siguiendo el protocolo descrito por Holmgren (1976). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml, 100 mM de tampón HEPES (pH 7,6), 32 mM  $MgCl_2$ , 4 mM ATP, 1,6 mg de serralbúmina bovina, 6 mM NADPH, 1,5 mM  $[^3H]CDP$  (31.000 cpm/nmol), 3,5  $\mu M$  tiorredoxina y 25  $\mu g$  de tiorredoxina reductasa de *E. coli*. En tubos eppendorf se añadieron, por este orden, 0,04 ml de mezcla de reacción y diferentes cantidades de extracto, completando con agua destilada hasta un volumen final de 0,12 ml. Los tubos se incubaron durante 20 min a 37°C, y la reacción se detuvo añadiendo 1 ml de 1 M  $HClO_4$ . A continuación se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min y el sobrenadante se hirvió durante 10 min, con una gota de rojo fenol, y se neutralizó con 4 M KOH. Finalmente se centrifugó a 17.000 x g durante 15 min. El sobrenadante se aplicó a columnas Dowex 50 para separar el  $[^3H]dCDP$  por cromatografía de intercambio iónico. Las columnas se lavaron con 100 ml de 200 mM ácido acético durante toda la noche, eluyéndose con 25 ml de 200 mM ácido acético (Reichard, 1962). 1 ml de este eluato se diluyó en 10 ml de Instagel (Packard) y se determinó la radiactividad del  $[^3H]dCDP$  en un contador de centelleo líquido Hewlett Packard (modelo 3255).

### *Actividad glutarredoxina*

La actividad glutarredoxina se determinó siguiendo el mismo protocolo descrito por Holmgren (1976) para la actividad ribonucleótido reductasa, con ligeras modificaciones. El extracto libre de células se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min; el sobrenadante se calentó a 85°C durante 5 min (la glutarredoxina es termoestable), se volvió a centrifugar a 12.000 x g durante 10 min y se almacenó a -20°C en tubos de plástico hasta su utilización. La mezcla de reacción fue idéntica a la descrita para la ribonucleótido reductasa salvo que la tiorredoxina y tiorredoxina reductasa se sustituyeron por 0,012 mM GSH (pH 5,0) y 0,01 mg de glutatión reductasa de levadura, en un volumen final de 1 ml. En tubos eppendorf se añadieron, por este orden, 0,04 ml de mezcla de reacción, diferentes cantidades de extracto y 0,01 ml de ribonucleótido reductasa de *E. coli* (1 mg/ml), completando con agua destilada hasta un volumen final de 0,12 ml. Los tubos se incubaron durante 20 min a 37°C, y la reacción se detuvo

añadiendo 1 ml de 1 M HClO<sub>4</sub>. La cantidad de [<sup>3</sup>H]dCDP del sobrenadante se determinó como se describe para la actividad ribonucleótido reductasa.

### *Actividad tiorredoxina*

Al igual que la actividad glutarredoxina, la actividad tiorredoxina se determinó siguiendo su capacidad de donar electrones a la ribonucleótido reductasa, con la única excepción de que la mezcla de reacción contenía 25 µg de tiorredoxina reductasa de *E. coli* en lugar de glutatión y glutatión reductasa.

### *Actividad tiorredoxina reductasa*

La actividad tiorredoxina reductasa se determinó en extractos libres de células centrifugados a 12.000 x g durante 10 min siguiendo la reducción de puentes disulfuro de la insulina por NADPH (Holmgren, 1977). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml, 260 mM tampón HEPES (pH 7,6), 10 mM EDTA, 2 mM NADPH y 1,03 mM de insulina bovina. En tubos de cristal se añadieron, por este orden, 0,04 ml de mezcla de reacción, diferentes cantidades de extracto y 0,01 ml de tiorredoxina de *E. coli* (6 mg/ml) completando con agua destilada hasta un volumen final de 0,12 ml. Los tubos se incubaron 20 min a 37°C y la reacción se detuvo añadiendo 0,5 ml de una solución 5,4 M de cloruro de guanidinio en 200 mM de Tris-HCl (pH 8,0) y DTNB 0,04 %. La actividad se determinó midiendo absorbancia a 412 nm.

### *Actividad glutatión reductasa*

La actividad glutatión reductasa se determinó en el sobrenadante de extractos libres de células centrifugados a 12.000 x g durante 10 min, siguiendo a 340 nm y 30°C el descenso de absorbancia del NADPH (Mata *et al.*, 1985). La mezcla de reacción contenía, en 1 ml de volumen final, 96 mM tampón fosfato potásico (pH 7,5), 2,5 mM GSSG y 0,12 mM NADPH. La reacción se inició añadiendo diferentes cantidades de extracto a 0,95 ml de mezcla de reacción y completando con agua destilada hasta un volumen final de 1 ml. Controles sin GSSG se usaron para corregir la actividad NADPH oxidasa presente en los extractos.

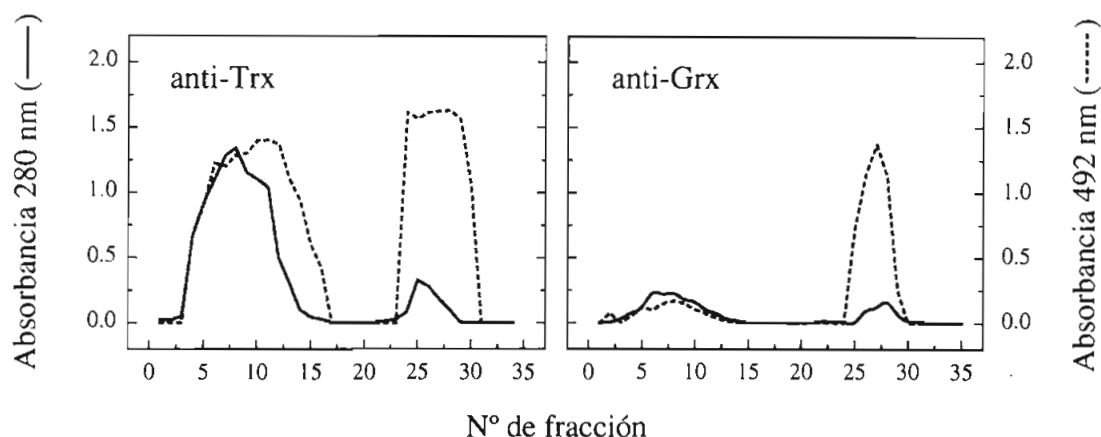
### II.3.6. Inmunoensayos

#### *Preparación y purificación de los anticuerpos*

Suero de conejo conteniendo anticuerpos anti-tiorredoxina y anti-glutarredoxina de *E. coli* fueron cedidos por el Profesor Arne Holmgren (Laboratory of Biochemistry, Medical Nobel Institute, Karolinska Institute, Stockholm, Suecia). Tras inactivar el complemento calentando a 56°C durante 15 min, la fracción de IgG se obtuvo por precipitación con sulfato amónico a saturación, seguida de diálisis frente a 40 mM tampón fosfato (pH 7,5) conteniendo 150 mM NaCl y 1 mM EDTA. A continuación 10 ml de este dializado se aplicaron a una columna de proteína A (10,2 ml de lecho) equilibrada con tampón de diálisis. Tras lavar exhaustivamente con el mismo tampón, la columna se eluyó con una mezcla de 150 mM NaCl y 0,58% ácido acético (pH 2,7) (v/v), recogándose fracciones de 1 ml en tubos que contenían 0,05 ml de 2 M Trizma Base. Las fracciones con absorbancia a 280 nm se mezclaron y se recromatografiaron de la misma forma.

Las IgG procedentes de proteína A se purificaron por inmunoadfinidad para obtener anticuerpos monoespecíficos. Los anticuerpos se dializaron frente a 10 mM PBS (pH 7,5) y se aplicaron a columnas (2,3 ml de lecho) que contenían 1 g de Sheparosa 4B acoplada con 3 mg de tiorredoxina ó 0,5 mg de glutarredoxina de *E. coli*, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmacia). Las columnas, equilibradas con 40 mM tampón fosfato (pH 7,5) conteniendo 150 mM NaCl y 1 mM EDTA, se cargaron con 10 ml de anticuerpos anti-Trx ó 4 ml de anticuerpos anti-Grx respectivamente. Tras lavar exhaustivamente con el mismo tampón, los anticuerpos unidos a las columnas se eluyeron con 1 ml de 500 mM ácido fórmico y se recogieron fracciones de 1 ml en tubos con 0,05 ml de 2 M Trizma Base. El contenido de proteína se determinó en dichas fracciones midiendo su absorbancia a 280 nm, y la presencia de anticuerpos monoespecíficos anti-Trx o anti-Grx se determinó mediante inmunoensayo (Figura 13). Las fracciones que contenían los anticuerpos se mezclaron y concentraron en un evaporador centrífugo (Speedvac, modelo SVC100, Savant). Este proceso se repitió varias veces hasta obtener suficiente anticuerpo primario.

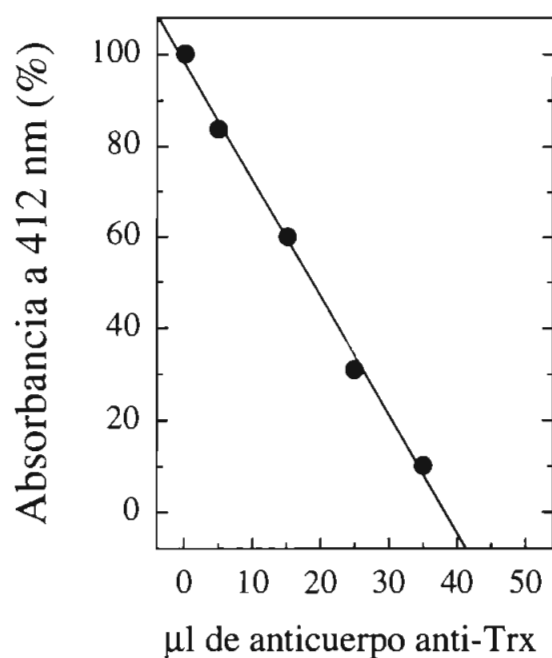




**Figura 13. Purificación por inmunoafinidad de los anticuerpos anti-Trx y anti-Grx.**

### *Titulación de los anticuerpos anti-Tiorredoxina*

Los anticuerpos anti-Trx se cuantificaron por su efecto inhibitor sobre la actividad tiorredoxina, medida por reducción de los disulfuros de la insulina en presencia de NADPH y tiorredoxina reductasa de *E. coli* (Homlgren, 1977). En tubos de cristal se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente distintas cantidades de anticuerpo (0-0,045 ml) y 90 ng de tiorredoxina de *E. coli* en un volumen final de 0,07 ml. Tras añadir 0,04 ml de mezcla de reacción (idéntica a la utilizada para determinar la actividad tiorredoxina reductasa) y 4,5  $\mu\text{g}$  de tiorredoxina reductasa, los tubos se incubaron 20 min a 37°C y la reacción se detuvo añadiendo 0,5 ml de una solución 5,4 M de cloruro de guanidinio en 200 mM Tris-HCl (pH 8,0) conteniendo DTNB 0,04 %. Para determinar el título de los anticuerpos se midió la absorbancia a 412 nm, se representó la absorbancia frente a las cantidades de anticuerpo, y se calculó el punto de corte con el eje de abscisas de la recta de regresión obtenida (Figura 14). Como controles se usaron un tubo sin anticuerpo y con tiorredoxina de *E. coli* (100%) y otro con anticuerpo pero sin tiorredoxina (0%). El título obtenido para el anticuerpo anti-Tiorredoxina fue de 0,183 nmol/ml.



**Figura 14.** Titulación de los anticuerpos anti-Trx purificados por inmunoafinidad.

### *Titulación de los anticuerpos anti-Glutarredoxina*

Los anticuerpos anti-Grx se titularon siguiendo la inhibición de la reducción enzimática de los disulfuros del sustrato prototipo HED mediada por glutarredoxina y GSH en presencia de NADPH (medido a 340 nm) y glutatión reductasa usando el ensayo previamente descrito (Holmgren, 1979a). La mezcla de reacción contenía en 1 ml de volumen final, 100 mM tampón Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM EDTA, 100 µg de seroalbúmina bovina, 1 mM GSH, 0.3 mM NADPH y 10 µg de glutatión reductasa de levadura. En tubos de cristal se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente distintas cantidades de anticuerpo (0-0,05 ml) con 2 µg de glutarredoxina de *E. coli*, completando con agua hasta un volumen final de 0,05 ml. Seguidamente se añadieron 0,5 ml de la mezcla de reacción y 0,025 ml conteniendo 0,375 µmoles de HED. Tras pasar a una cubeta de cuarzo la mezcla resultante se determinó el descenso de absorbancia a 340 nm. Para determinar el título de los anticuerpos, se representó la variación de absorbancia frente a las cantidades de anticuerpo, y se calculó el punto de corte con el eje de abscisas de la recta de regresión obtenida (Figura 15). El título obtenido para el anticuerpo anti-Grx fue de 0,531 nmol/ml.

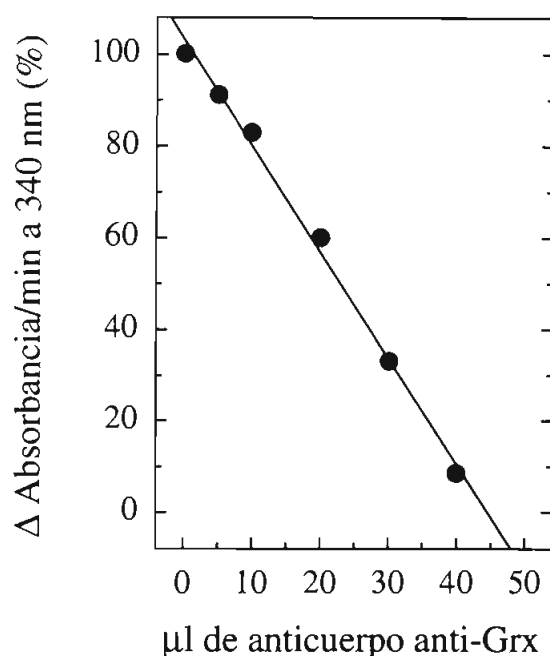


Figura 15. Titulación de los anticuerpos anti-Grx purificados por inmunoafinidad.

### *Determinación de tiorredoxina y glutarredoxina por inmunoensayo*

La cuantificación de Trx y Grx se realizó por inmunoensayo indirecto competitivo siguiendo un protocolo previamente desarrollado para glutarredoxina de mamíferos (Martínez-Galisteo *et al.*, 1994). Los extractos libres de células empleados para esta determinación fueron los mismos que los usados en los ensayos de actividad tiorredoxina o glutarredoxina. El antígeno, Trx o Grx, disuelto en 50 mM tampón bicarbonato (pH 9,6) se inmovilizó en placas de 96 pocillos (100 ng/pocillo) incubando durante una noche a 4°C con agitación suave. Al mismo tiempo, 0,3 ml de diluciones seriadas de los extractos se incubaron con 0,3 ml de una dilución 1:25.000 (en tampón PTB) del anticuerpo primario (mezcla de competición) en las mismas condiciones usadas para inmovilizar el antígeno. Todos los procesos subsiguientes estuvieron separados por lavados durante 2 min por triplicado de la placa de inmunoensayo con tampón PBS-T. Las incubaciones se realizaron a 37°C y con agitación suave.

A cada pocillo se añadió 0,2 ml de tampón de bloqueo y se incubó 1 h. A continuación 0,2 ml de la mezcla de competición se incubó durante 2 h con el

antígeno inmovilizado en cada pocillo. El anticuerpo primario unido al antígeno se cuantificó mediante el sistema avidina-biotina peroxidasa (Kemeny, 1991). A tal efecto, 0,2 ml de anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo) desarrollado en cabra y conjugado con biotina, diluido 1:5.000 en tampón PTB, se incubó durante 1 h con el anticuerpo primario inmovilizado. El complejo antígeno-anticuerpo 1°-anticuerpo 2°, se incubó durante 20 min con 0,2 ml de un complejo avidina-peroxidasa biotinilada diluido 200 veces (ABC kit VECTASTAIN<sup>®</sup>, Vector Laboratories). La actividad peroxidasa se desarrolló durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad, usando *o*-fenilendiamina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustratos; la reacción se detuvo con 0,05 ml de 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se determinó la absorbancia a 492 nm. Los resultados se cuantificaron usando un ajuste logit-log y una regresión lineal (Shaw *et al.*, 1977).

Cada placa contenía un control con diluciones seriadas (8 puntos) de una solución patrón de tiorredoxina o glutarredoxina de *E. coli*. Todos los pocillos se prepararon por duplicado y se realizaron, al menos, tres medidas independientes en distintos días.

### **II.3.7. Detección electroquímica de glutatión oxidado, reducido y disulfuros mixtos**

#### ***Obtención de los extractos***

Cultivos estacionarios en 10 ml de LB de cada estirpe se centrifugaron y resuspendieron en tampón VB; 5 ml de esta suspensión se reinocularon en 1 l de medio mínimo VB suplementado con 2 g/l de casaminoácidos y se recrecieron hasta alcanzar el estado estacionario (Alonso-Moraga *et al.*, 1987). Los cultivos se centrifugaron a 15.000 x g y el precipitado se distribuyó en viales de plástico (200 mg/vial) almacenándose a -80° hasta su utilización.

Para determinar el GSH, el precipitado se descongeló, se resuspendió en un volumen 5 veces su peso de 1 M HClO<sub>4</sub> con 2 mM EDTA, y se sonicó en un baño de ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente (Alonso-Moraga *et al.*, 1987). El extracto resultante se centrifugó a 31.000 x g durante 20 min y el precipitado se reextrajo con un segundo tratamiento con ácido perclórico. Se mezclaron ambos sobrenadantes, se les midió el volumen y se pasaron a través de un filtro de polisulfona (0,2 µm Ø), y se almacenaron a -80° en tubos eppendorf.

Para determinar el GSSG, la extracción se realizó como se acaba de describir para el GSH, salvo que, para evitar la excesiva dilución, el precipitado se resuspendió en un volumen 2 veces su peso de 1 M  $\text{HClO}_4$  con 2 mM EDTA y no hubo segunda reextracción.

Para determinar los disulfuros mixtos, el precipitado resultante tras extraer el GSH se resuspendió en 1 ml de 100 mM tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM KOH (1:3 v/v, pH12) al que se añadió 0,1 ml 30 mM DTT recién preparado, para reducir los disulfuros mixtos proteína-glutación. La mezcla se trató en un baño de ultrasonidos durante 30 min a temperatura ambiente, se le añadió 0,5 ml de acetonitrilo y 0,1 ml de 3,5 M  $\text{HClO}_4$ , se mantuvo 15 min en hielo y se centrifugó a 31 000 x g durante 20 min. El sobrenadante se recogió, se midió su volumen, se pasó a través de un filtro de polisulfona (0,2  $\mu\text{m}$  Ø), y se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  en tubos eppendorf.

### *Determinación de glutatión oxidado, reducido y disulfuros mixtos*

El glutatión oxidado o reducido se determinó por HPLC de fase reversa acoplada con detección electroquímica (Rodríguez-Ariza *et al.*, 1994). La separación se realizó en un cromatógrafo líquido Beckman equipado con módulo programable de reparto de solvente (modelo 126), inyector automático (modelo 502) para 0,02 ml, e interfase analógica (modelo 406). Se usó un detector ESA (modelo Coulochem II) equipado con una guardacélula (modelo 5020) y una célula analítica (modelo 5011). El control cromatográfico y la captura de datos se realizó mediante un ordenador Compaq Deskpro 386/20e usando el software System Gold version 6.0 de Beckman.

La separación cromatográfica se realizó en una columna analítica de fase reversa Supelcosil LC-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  Ø partícula, 100 Å Ø poro), protegida con una precolumna Supelguard (20 x 4,6 mm), ambas obtenidas de Supelco. La elución se llevó a cabo isocráticamente con una fase móvil de 20 mM tampón fosfo sódico (pH 2,7). La fase móvil se preparó con agua ultrapura obtenida de un sistema Milli-Q (Millipore) y fue degaseada en vacío y pasada a través un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore).

La separación se realizó a temperatura ambiente con un flujo de 1,5 ml/min. La fase móvil fue gaseada continuamente con un ligero flujo de He

durante la cromatografía. Los potenciales del multidetector Coulochem II fueron: guardacélula +0,900 V; detector 1, +0,450 V; detector 2, +0,800 V. La corriente fue de 5  $\mu$ A en el caso de GSH y 1  $\mu$ A en el caso de GSSG. Los extractos se diluyeron 20-50 veces para determinar GSH y disulfuros mixtos proteína-SSG, y se inyectaron sin diluir para determinar GSSG. Los picos de GSH y GSSG se identificaron como se había descrito previamente (Rodríguez-Ariza *et al.*, 1994). Los límites de detección para GSH y GSSG fueron 87 y 76 pmoles, respectivamente.

La linealidad de la respuesta del detector se verificó inyectando soluciones patrón de GSH y GSSG puros. Se preparó en fase móvil una solución patrón que contenía 10 mg/ml de GSH y de GSSG y se almacenó a -80°C. Soluciones de trabajo con concentraciones comprendidas entre 100 y 5.000 ng/ml se prepararon diariamente diluyendo la solución patrón en fase móvil.

### **II.3.8. Determinación de proteína**

En los ensayos de actividad enzimática, la proteína se determinó por el método de Bradford (1976). Para las determinaciones por inmunoensayo, la proteína se determinó por el método del ácido bicinconínico (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## II.4. SOLUCIONES Y MEDIOS.

### Solución salina VB (Vogel and Bonner, 1956):

- **Uso:** Resuspensión y dilución de las estirpes de *Escherichia coli* y componente del medio mínimo.
- **Composición:**
  - SO<sub>4</sub>Mg • 7H<sub>2</sub>O (pm=246,48): 0,2 g.
  - Ácido cítrico (pm=210,10): 2 g.
  - PO<sub>4</sub>K<sub>2</sub>H • 3H<sub>2</sub>O (pm=228,18): 13 g.
  - PO<sub>4</sub>NaH<sub>2</sub>NH<sub>4</sub> • 4H<sub>2</sub>O (pm=209,07): 3,5 g.
  - Completar con agua destilada hasta un litro.
- Disolver y esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### Solución de glucosa:

- **Uso:** Componente del medio mínimo y del medio LA10.
- **Composición:**
  - D(+)Glucosa (pm=180,16): 20 g.
  - Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Disolver y esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### Solución de adenina:

- **Uso:** Componente del medio mínimo.
- **Composición:**
  - Adenina (pm=171,60): 1,35 g.
  - Completar con 0,1 N HCl hasta 100 ml.
- Disolver y esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### Solución de arginina:

- **Uso:** Requerimiento en medio mínimo para las estirpes portadoras de la mutación *arg56*.
- **Composición:**
  - L-arginina (pm=210,70): 1 g.
  - Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Disolver y esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### Solución de biotina:

- **Uso:** Requerimiento en medio mínimo para las estirpes portadoras de la delección *ΔuvrB*.
- **Composición:**
  - D-biotina (pm=244,30): 0,5 g.
  - Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Añadir unas gotas de sosa, disolver hasta hacer transparente la solución y esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A temperatura ambiente y protegida de la luz.

**Solución de ácido nicotínico:**

- **Uso:** Requerimiento en medio mínimo para estirpes portadoras de la mutación *nad113*.
- **Composición:**  
Ácido nicotínico (pm=123,10): 0,5 g.  
Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Disolver y esterilizar por filtración con un filtro bacteriológico de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
- **Conservación:** A temperatura ambiente y protegido de la luz.

**Solución de tiamina:**

- **Uso:** Componente del medio mínimo.
- **Composición:**  
Tiamina (pm=337,3): 0,5 g.  
Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Disolver y esterilizar por filtración con un filtro bacteriológico de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
- **Conservación:** A temperatura ambiente y protegido de la luz.

**Solución de metionina:**

- **Uso:** Componente del medio mínimo en determinados casos y requerimiento en medio mínimo para estirpes portadoras de la mutación *metE163::Tn10*.
- **Composición:**  
L-metionina (pm=149,20): 1 g.  
Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Disolver y esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

**Solución de cistina:**

- **Uso:** Componente del medio mínimo en determinados casos.
- **Composición:**  
L-cistina (pm=240,30): 8,73 g.  
Completar con 1 N HCl hasta 100 ml.
- Disolver y esterilizar por filtración con un filtro bacteriológico de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
- **Conservación:** A temperatura ambiente y protegido de la luz.

**Solución de ácido lipoico:**

- **Uso:** Requerimiento en medio mínimo para estirpes portadoras de la mutación *lip2*.
- **Composición:**  
Ácido lipoico (pm=206,30): 0,005 g.  
Añadir 1 ml de etanol y disolver.  
Completar con agua destilada hasta 100ml.
- Esterilizar por filtración con un filtro bacteriológico de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
- **Conservación:** A temperatura ambiente y protegido de la luz.

**Solución de acetato sódico:**

- **Uso:** Factor de crecimiento para estirpes portadoras de la mutación *lip2*.
- **Composición:**



$\text{CH}_3\text{COONa}$  (pm=82,03): 32,82 g.

Completar con agua destilada hasta 100ml.

- Disolver y esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### Solución de succinato sódico:

- **Uso:** Factor de crecimiento para estirpes portadoras de la mutación *lip2*.

- **Composición:**

$(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (pm=270,16): 10,8 g.

Completar con agua destilada hasta 100ml.

- Disolver y esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### Solución de glicerina:

- **Uso:** Componente del medio mínimo y medio selectivo para mutantes  $\text{Ara}^r$ .

- **Composición:**

Glicerol 87% (pm=92,09): 23 ml.

Completar con agua destilada hasta 100 ml.

- Esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### Solución de arabinosa:

- **Uso:** Componente del medio selectivo para mutantes  $\text{Ara}^r$ .

- **Composición:**

L(+)-Arabinosa (pm=150,1): 20 g.

Completar con agua destilada hasta 100 ml.

- Disolver y esterilizar por filtración con un filtro bacteriológico de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
- **Conservación:** A 4°C.

### Solución de cloruro cálcico:

- **Uso:** Componente del medio LA10 y suplemento del medio nutritivo LB en las diluciones del fago P1vir.

- **Composición:**

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (pm=146,99): 7,35 g.

Completar con agua destilada hasta 100 ml.

- Disolver y esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### Solución de citrato sódico:

- **Uso:** Quelante de iones  $\text{Ca}^{++}$  para detener las transducciones mediadas por el fago P1vir y componente de la solución OPD en los inmunoensayos.

- **Composición:**

$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (pm=294,10): 5,88 g.

Completar con agua destilada hasta 100 ml.

- Disolver y esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

**Tampón fosfato:**

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad glutatión reductasa.
- **Composición:**
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pm=141,96): 2,84 g.
  - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (pm=156,01): 3,10 g.
- Disolver, ajustar a pH 7, completar con agua destilada hasta 100 ml y esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A4°C.

**Solución RFI (Hanahan, 1985):**

- **Uso:** Preparación de bacterias competentes.
- **Composición:**
  - $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (pm=197,90): 0,99 g.
  - $\text{CH}_3\text{COOK}$  (pm=98,14): 3 ml de un stock 1 M pH 7,5.
  - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (pm= 146,99): 0,15 g.
  - Glicerol 87% (pm=92,09): 15 g.
  - KCl (pm=74,55): 0,75 g.
- Disolver, ajustar a pH 5,8, completar con agua destilada hasta 100 ml y esterilizar por filtración con un filtro bacteriológico de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
- **Conservación:** A4°C.

**Solución RFII (Hanahan, 1985):**

- **Uso:** Preparación de bacterias competentes.
- **Composición:**
  - NaMOPS (pm=231,20): 2 ml de un stock 0,5 M pH 7.
  - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (pm= 146,99): 1,1 g.
  - Glicerol 87% (pm=92,09): 15 g.
  - KCl (pm=74,55): 0,075 g.
- Disolver, ajustar a pH 6,8, completar con agua destilada hasta 100 ml y esterilizar por filtración con un filtro bacteriológico de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
- **Conservación:** A4°C.

**Solución de acetato potásico:**

- **Uso:** Componente de la solución RFI.
- **Composición:**
  - $\text{CH}_3\text{COOK}$  (pm=98,14): 9,81 g.
  - Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Disolver y esterilizar por filtración con un filtro bacteriológico de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
- **Conservación:** A4°C.

**Solución de MOPS sódico:**

- **Uso:** Componente de la solución RFII.
- **Composición:**
  - NaMOPS (pm=231,20): 11,56 g.
  - Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Disolver y esterilizar por filtración con un filtro bacteriológico de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
- **Conservación:** A4°C.

### Solución de ampicilina:

- **Uso:** Comprobación de la ausencia/presencia de pKM101, pBR322 y plásmidos derivados.
- **Composición:**  
Ampicilina (pm=371,39): 0,04 g.  
Completar con agua destilada hasta 5 ml.
- **Conservación:** A 4°C.

### Solución de tetraciclina:

- **Uso:** Comprobación de la ausencia/presencia de pBR322 y plásmidos derivados así como del transposón Tn10.
- **Composición:**  
Tetraciclina (pm=480,90): 0,02 g.  
Completar con agua destilada hasta 5 ml.
- **Conservación:** A 4°C.

### Solución de kanamicina:

- **Uso:** Comprobación de la ausencia/presencia del cassette de resistencia a kanamicina o del transposón Tn10kan.
- **Composición:**  
Kanamicina (pm=484,50): 0,04 g.  
Completar con agua destilada hasta 5 ml.
- **Conservación:** A 4°C.

### Tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 1 mM EDTA:

- **Uso:** Tampón de extracción en la preparación de extractos libres de células de *E. coli* para ensayos de actividad ribonucleótido reductasa, tiorredoxina, glutarredoxina, glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa, así como para los inmunoensayos.
- **Composición:**  
Trizma Base (pm=121,1) 6,06 g.  
Disolver con agua destilada hasta 500 ml.
- Se ajusta la solución a pH 7,5 con HCl concentrado, se añade EDTA (pm=358,2) a una concentración final de 1 mM y se completa con agua destilada hasta 1 l.
- **Conservación:** A 4°C.

### Tampón HEPES 1 M (pH 7,6):

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad ribonucleótido reductasa, glutarredoxina, tiorredoxina y tiorredoxina reductasa.
- **Composición:**  
HEPES (pm=238,3) 23,83 g.
- Disolver, ajustar a pH 7,6 con HCl concentrado y completar con agua destilada hasta 100 ml..
- **Conservación:** A -20°C.

### Solución de cloruro magnésico:

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad ribonucleótido reductasa, glutarredoxina y tiorredoxina.
- **Composición:**

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (pm=203,31): 4,06 g.

Completar con agua destilada hasta 100 ml.

- **Conservación:** A -20°C.

### Solución de ATP:

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad ribonucleótido reductasa, glutarredoxina y tiorredoxina.

- **Composición:**

ATP (pm=509,2): 5,09 g.

Completar con agua destilada hasta 100 ml.

- **Conservación:** A -20°C.

### Solución de BSA:

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad ribonucleótido reductasa, glutarredoxina y tiorredoxina y de la mezcla de reacción para el ensayo HED en la titulación de anticuerpos anti-glutarredoxina.

- **Composición:**

BSA (pm aprox.=66.000): 2 g.

Completar con agua destilada hasta 100 ml.

- **Conservación:** A -20°C.

### Solución de NADPH:

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad ribonucleótido reductasa, glutarredoxina, tiorredoxina, tiorredoxina reductasa y de la mezcla de reacción para el ensayo de reducción del HED en la titulación de anticuerpos anti-glutarredoxina.

- **Composición:**

NADPH (pm=743,4): 10 mg.

Completar con agua destilada hasta 0,25 ml.

- Preparar inmediatamente antes de usar.

### Solución de [ $^3\text{H}$ ]CDP 25 mM (31.000 cpm/nmol):

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad ribonucleótido reductasa, glutarredoxina y tiorredoxina.

- **Composición:**

[ $^3\text{H}$ ]CDP (pm=403,2).

- Se toman 0,2 ml de la solución comercial de [ $^3\text{H}$ ]CDP (Amersham) y se evapora en una bomba de vacío el alcohol en el que viene disuelto. Una vez evaporado se disuelve en 0,1 ml de CDP (25 mg/ml) y se miden las cpm/nmol, diluyendo con la misma solución de CDP hasta alcanzar las 31.000 cpm/nmol.

- **Conservación:** A -20°C.

### Solución de CDP:

- **Uso:** Solvente del [ $^3\text{H}$ ]CDP usado en los ensayos de actividad ribonucleótido reductasa, glutarredoxina y tiorredoxina.

- **Composición:**

CDP (pm=401,2) 2,5 g.

Completar con agua destilada hasta 100 ml.

- **Conservación:** A -20°C.

### Solución de tioredoxina de *E. coli*:

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad ribonucleótido reductasa.
- **Composición:**  
Tiorredoxina (pm aprox.=12.000) 12 mg.  
Completar hasta 10 ml con 50 mM tampón Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA.
- **Conservación:** A -20°C.

### Solución de tioredoxina reductasa de *E. coli*:

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad ribonucleótido reductasa, tioredoxina y titulación de los anticuerpos anti-tiorredoxina.
- **Composición:**  
Tiorredoxina reductasa (pm aprox.=70.000) 0,45 mg.  
Completar hasta 1 ml con 50 mM tampón Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA.
- **Conservación:** A -20°C.

### Solución de ácido perclórico:

- **Uso:** Parada de la reacción en los ensayos de actividad ribonucleótido reductasa, glutarredoxina y tioredoxina.
- **Composición:**  
 $\text{HClO}_4$  (pm=100,5) 10,05 g.  
Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### Solución de rojo fenol:

- **Uso:** Indicador de pH en los ensayos de actividad ribonucleótido reductasa, glutarredoxina y tioredoxina.
- **Composición:**  
Rojo Fenol (pm=354,4) 1 g.
- Se disuelve el fenol rojo en unos 10 ml de alcohol macerando en un mortero y añadiendo poco a poco el alcohol restante hasta completar un volumen de 100 ml.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### Solución de hidróxido potásico:

- **Uso:** Neutralizante en los ensayos de actividad ribonucleótido reductasa, glutarredoxina y tioredoxina.
- **Composición:**  
KOH (pm=56,11) 22,44 g.  
Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### Solución de ácido acético:

- **Uso:** Eluyente de las columnas Dowex-50 para la purificación del  $[^3\text{H}]\text{dCDP}$  en los ensayos de actividad ribonucleótido reductasa, glutarredoxina y tioredoxina.
- **Composición:**  
 $\text{CH}_3\text{COOH}$  (pm=60,03) 12,01 g.  
Completar con agua destilada hasta 1 litro.
- Preparar inmediatamente antes de usar.

**Solución de glutatión reducido:**

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad glutarredoxina y de la mezcla de reacción para el ensayo HED en la titulación de anticuerpos anti-glutarredoxina.
- **Composición:**  
GSH (pm=307,3) 0,037 g.  
Completar con agua destilada hasta 1 ml.
- Se ajusta la solución a pH 5 con tampón fosfato 30 mM pH 2,3 para evitar la oxidación del glutatión.
- **Conservación:** A -80°C.

**Solución de glutatión reductasa de levadura:**

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad glutarredoxina y de la mezcla de reacción para el ensayo de reducción del HED en la titulación de anticuerpos anti-glutarredoxina e identificación del pico de glutatión oxidado por HPLC.
- **Composición:**  
Glutatión reductasa (pm aprox.=110.000) 0,57 mg.  
Completar hasta 1 ml con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 1 mM EDTA.
- **Conservación:** A -20°C.

**Solución de ribonucleótido reductasa de *E. coli*:**

- **Uso:** Componente de los ensayos de actividad glutarredoxina y tiorredoxina.
- **Composición:**  
Ribonucleótido reductasa (pm aprox.=258.000) 1 mg.  
Completar hasta 1 ml con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 1 mM EDTA.
- **Conservación:** A -80°C.

**Solución de EDTA:**

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad tiorredoxina reductasa y de la mezcla de reacción para el ensayo de reducción del HED en la titulación de anticuerpos anti-glutarredoxina.
- **Composición:**  
EDTA (pm=358,2) 7,16 g.  
Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- **Conservación:** A -20°C.

**Solución de insulina bovina:**

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad tiorredoxina reductasa.
- **Composición:**  
Insulina bovina (pm=5.733,5) 0,92 g.  
Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- **Conservación:** A -20°C.

**Solución de tiorredoxina de *E. coli* (0,5 mM):**

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad TRasa.
- **Composición:**  
Tiorredoxina (pm aprox.=12.000) 60 mg.

Completar hasta 10 ml con 50 mM tampón Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA.

- **Conservación:** A -20°C.

### **Solución de DTNB:**

- **Uso:** Componente de la mezcla de parada de reacción en los ensayos de actividad tiorredoxina reductasa.
- **Composición:**  
DTNB (pm = 396,3) 0,4 g.  
Completar hasta 100 ml con alcohol absoluto.
- **Conservación:** A -20°C.

### **Solución de hidrocloreuro de guanidinio:**

- **Uso:** Componente de la mezcla de parada de reacción en los ensayos de actividad tiorredoxina reductasa.
- **Composición:**  
Hidrocloreuro de guanidinio (pm=95,53) 57,32 g (6 M).  
Completar hasta 100 ml con 200 mM Tris-HCl (pH 8).
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### **Tampón Tris-HCl 200 mM (pH 8,0):**

- **Uso:** Solvente del cloruro de guanidinio en la mezcla de parada de reacción de los ensayos de actividad tiorredoxina reductasa y de la mezcla de reacción para el ensayo de reducción del HED en la titulación de anticuerpos anti-glutarredoxina.
- **Composición:**  
Trizma Base (pm=121,1) 24,22 g.  
Disolver en agua destilada hasta 500 ml.
- Se ajusta la solución a pH 8,0 con HCl concentrado y se completa con agua destilada hasta 1 l.
- **Conservación:** A 4°C.

### **Solución de hidrocloreuro de guanidinio - DTNB:**

- **Uso:** Mezcla de parada de reacción en los ensayos de actividad tiorredoxina reductasa y titulación de los anticuerpos anti-tiorredoxina.
- **Composición** para 100 ml:  
Cloruro de guanidinio 90 ml de una solución stock 6 M.  
DTNB 10 ml de una solución stock 1 mM.
- Preparar inmediatamente antes de usar.

### **Solución de glutatión oxidado:**

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad glutatión reductasa.
- **Composición:**  
GSSG (pm=612,6) 0,077 g.  
Completar con agua destilada hasta 1 ml.
- Preparar inmediatamente antes de usar.

### **Solución de NADPH:**

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad TRasa.
- **Composición:**  
NADPH (pm=743,4): 3 mg.

Completar con agua destilada hasta 0,25 ml.

- Preparar inmediatamente antes de usar.

### **Tampón fosfato 40 mM:**

- **Uso:** Componente de la mezcla de reacción en los ensayos de actividad glutatión reductasa.
- **Composición:**
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pm=141,96): 5,67 g.
  - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (pm=156,01): 6,24 g.
- Disolver, ajustar a pH 7,5 y completar con agua destilada hasta 1 litro.
- **Conservación:** A 4°C.

### **Tampón fosfato 40 mM (pH 7,5) NaCl (150 mM) EDTA (1 mM):**

- **Uso:** Tampón de diálisis para los anticuerpos anti-tiorredoxina y anti-glutarredoxina y tampón de lavado de las columnas Sepharosa 4B.
- **Composición** para 1 litro:
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pm=141,96): 5,67 g.
  - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (pm=156,01): 6,24 g.
- Disolver, ajustar a pH 7,5. Añadir NaCl y EDTA a una concentración final de 150 mM y 1 mM respectivamente y completar con agua destilada hasta 1 litro.
- **Conservación:** A 4°C.

### **Tampón NaCl (150 mM), 0,58% $\text{CH}_3\text{COOH}$ (pH 2,7):**

- **Uso:** Eluyente de las columnas de proteína A.
- **Composición:**
  - NaCl (pm=58,44): 8,77 g.
  - $\text{CH}_3\text{COOH}$  (pm=60,03): 5,8 g.
- Disolver, ajustar a pH 2,7 y completar con agua destilada hasta 1 litro.
- **Conservación:** A 4°C.

### **Solución de Trizma Base:**

- **Uso:** Neutralizante del eluato de las columnas de proteína A y Sepharosa 4B.
- **Composición:**
  - Trizma Base (pm=121,1) 24,22 g.
  - Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- **Conservación:** A 4°C.

### **Solución de ácido fórmico:**

- **Uso:** Eluyente de las columnas Sepharosa 4B.
- **Composición:**
  - $\text{CH}_2\text{O}_2$  (pm=46,03): 2,3 g.
  - Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- **Conservación:** A 4°C.

### **Solución de tiorredoxina de *E. coli*:**

- **Uso:** Titulación de los anticuerpos anti-tiorredoxina.
- **Composición:**
  - Tiorredoxina (pm aprox.=12.000) 60 µg.
  - Completar hasta 10 ml con 50 mM tampón Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA.
- **Conservación:** A -20°C.



### **Solución de glutarredoxina de *E. coli*:**

- **Uso:** Titulación de los anticuerpos anti-glutarredoxina.
- **Composición:**
  - Glutarredoxina (pm aprox.=10.000) 2 mg.
  - Completar hasta 10 ml con 50 mM tampón Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA.
- **Conservación:** A -20°C.

### **Solución de HED:**

- **Uso:** Titulación de los anticuerpos anti-glutarredoxina.
- **Composición:**
  - HED (pm=154,25) 0,23 g.
  - Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Preparar inmediatamente antes de usar.

### **Tampón bicarbonato 50 mM (pH 9,6):**

- **Uso:** Tampón de revestimiento para tapizar con el antígeno las placas de inmunoensayo.
- **Composición:**
  - $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pm=106,00) 0,40 g.
  - $\text{NaHCO}_3$  (pm=84,01) 0,73 g.
  - Completar con agua destilada hasta 250 ml.
- **Conservación:** A 4°C.

### **Tampón PBS 100 mM (pH 7,4):**

- **Uso:** Componente de los tampones de lavado, de incubación y de bloqueo en los inmunoensayos.
- **Composición:**
  - $\text{NaCl}$  (pm=58,44) 8 g.
  - $\text{KCl}$  (pm=74,55) 0,2 g.
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pm=136,10) 0,2 g.
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pm=142,00) 1,15 g.
- Disolver, ajustar a pH 7,4 y completar con agua destilada hasta 1 litro.
- **Conservación:** A 4°C.

### **Tampón PBS-T (pH 7,4):**

- **Uso:** Tampón de lavado en los inmunoensayos.
- **Composición** para 1 litro:
  - 100 ml de una solución de 100 mM tampón PBS, pH 7,4.
  - Tween-20 (pm=1.227,54) 5 ml.
  - Completar con agua destilada hasta 1 litro.
- **Conservación:** A 4°C.

### **Tampón PTB (pH 7,4):**

- **Uso:** Tampón de incubación y dilución de anticuerpos en los inmunoensayos.
- **Composición** para 1 litro:
  - 100 ml de una solución de 100 mM tampón PBS pH 7,4.
  - Tween-20 (pm=1.227,54) 0,5 ml.
  - BSA (pm aprox.=66.000) 5 g.
  - Completar con agua destilada hasta 1 litro.
- **Conservación:** A 4°C.

**Tampón de bloqueo PBS-T, BSA:**

- **Uso:** Tampón de bloqueo en los inmunoensayos.
- **Composición:**
  - Tampón PBS-T pH 7,4 (10 mM) 1 litro.
  - BSA (pm aprox.=66.000) 20 g.
- Disolver.
- **Conservación:** A4°C.

**Solución de fosfato disódico 200 mM (pH 7,0):**

- **Uso:** Componente de la solución OPD en los inmunoensayos.
- **Composición:**
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pm=141,96): 5,68 g.
- Disolver, ajustar a pH 7,0 y completar con agua destilada hasta 100 ml.
- **Conservación:** A4°C.

**Solución OPD:**

- **Uso:** Revelador de la reacción peroxidasa en los inmunoensayos.
- **Composición:**
  - o-fenilendiamina (pm=108,10): 25 mg.
  - $\text{H}_2\text{O}_2$  (pm=34,01): 10  $\mu\text{l}$ .
  - Citrato sódico (pm=294,10): 2,55 ml de una solución stock 0,2 M.
  - Fosfato disódico (pm=141,96): 5,30 ml de una solución stock 200 mM pH 7,0.
  - Completar con agua destilada hasta 20 ml.
- Preparar inmediatamente antes de usar.

**Solución de ácido sulfúrico:**

- **Uso:** Parada de la reacción peroxidasa en los inmunoensayos.
- **Composición:**
  - $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pm=98,07): 11,11 ml.
  - Verter los 11,11 ml de ácido sobre agua destilada y completar hasta 100 ml.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

**Solución de casaminoácidos:**

- **Uso:** Componente del medio mínimo en determinados casos.
- **Composición:**
  - Casaminoácidos 20 g.
  - Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Disolver y esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

**Solución de ácido perclórico EDTA:**

- **Uso:** Protocolo de extracción de glutatión reducido y oxidado.
- **Composición:**
  - $\text{HClO}_4$  (pm=100,5): 6 ml.
  - Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Se añade EDTA a una concentración final de 2 mM.
- **Conservación:** A4°C.

### Solución de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :

- **Uso:** Componente del tampón de extracción de los disulfuros mixtos.
- **Composición:**  
 $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  (pm=136,10): 1,36 g.  
Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- **Conservación:** A 4°C.

### Solución de KOH:

- **Uso:** Componente del tampón de extracción de los disulfuros mixtos.
- **Composición:**  
KOH (pm=56,11): 0,56 g.  
Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- **Conservación:** A 4°C.

### Tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (100 mM), KOH (100 mM) 1:3 v/v (pH 12):

- **Uso:** Tampón de extracción de disulfuros mixtos.
- **Composición:**  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pm=136,10): 25 ml de una solución stock 0,1 M.  
KOH (pm=56,11): 75 ml de una solución stock 0,1 M.
- Ajustar a pH 12.
- **Conservación:** A 4°C.

### Solución de DTT:

- **Uso:** Protocolo de extracción de disulfuros mixtos.
- **Composición:**  
DTT (pm=154,2): 0,0046 g.  
Disolver en agua destilada hasta 1 ml.
- Preparar inmediatamente antes de usar.

### Solución de ácido perclórico:

- **Uso:** Protocolo de extracción de disulfuros mixtos.
- **Composición:**  
 $\text{HClO}_4$  (pm=100,5): 21 ml.  
Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- **Conservación:** A 4°C.

### Tampón fosfato sódico 20 mM (pH 2,7):

- **Uso:** Fase móvil en la separación del glutatión por HPLC con detección electroquímica.
- **Composición:**  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (pm=137,99): 2,76 g.
- Disolver, ajustar a pH 2,7 con ácido fosfórico, completar con agua destilada hasta 1 litro y filtrar con un filtro bacteriológico de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
- Preparar inmediatamente antes de usar

### Agar de cobertera (Maron y Ames, 1983):

- **Uso:** Siembra de bacterias.
- **Composición:**  
NaCl (pm=58,44): 0,5 g.  
Bacto-agar: 0,6 g.

Completar con agua destilada hasta 100 ml.

- Después de esterilizar en el autoclave agitar para que el agar se distribuya uniformemente y dejar solidificar a temperatura ambiente. Antes de su utilización fundir completamente en un horno microondas. Distribuir en tubos de 10 x 100 mm a razón de 2 ml por tubo. Mantener éstos a 45°C en un termostato de bloque metálico.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### **Medio nutritivo SOB (Hanahan, 1985):**

- **Uso:** Crecimiento de bacterias en el protocolo de obtención de células competentes.
- **Composición:**
  - Bacto-Triptona: 20 g.
  - Extracto de levadura: 5 g
  - NaCl (pm=58,44): 6 g.
  - MgCl<sub>2</sub> • 6H<sub>2</sub>O (pm=203,3): 2 g.
  - Completar con agua destilada hasta 1 litro.
- Disolver y esterilizar en el autoclave.
- **Conservación:** A temperatura ambiente.

### **Medio nutritivo LB (Maron y Ames, 1983):**

- **Uso:** Crecimiento de bacterias, estimación del número de viables y comprobación del fenotipo.
- **Composición:**
  - Bacto-Triptona: 10 g.
  - Extracto de levadura: 5 g.
  - NaCl (pm=58,44): 5 g.
  - Bacto-agar (opcional): 15 g.
  - Completar con agua destilada hasta 1 litro.
- El Bacto-agar se añade cuando se desea preparar medio nutritivo sólido. Una vez estéril, el medio se reparte en cajas de Petri a razón de 25 ml/caja. Cuando ha solidificado el medio las cajas se secan boca abajo en una estufa a 37°C durante 24 horas.

### **Medio nutritivo LA10 (Blanco, 1976):**

- **Uso:** Preparación de lisados del fago P1 vir.
- **Composición:**
  - Bacto-Triptona: 10 g.
  - Extracto de levadura: 5 g.
  - NaCl (pm=58,44): 5 g.
  - Bacto-agar: 10 g.
  - Completar con agua destilada hasta 1 litro.
- Una vez estéril, el medio se reparte en cajas de Petri a razón de 25 ml/caja. Cuando se ha solidificado el medio las cajas se utilizan inmediatamente.
- **Conservación:** A temperatura ambiente durante no más de dos semanas.

### **Medio mínimo no selectivo:**

- **Uso:** Crecimiento de bacterias y protocolo de selección de auxótrofos.
- **Composición** para 1 litro:
  - Solución salina VB: g correspondientes a un litro disueltos en 975 ml de agua destilada.
  - D(+)Glucosa (pm=180,16): 10 ml de una solución stock 20%.

- Adenina (pm=171,60): 7,5 ml de una solución stock 1,35%/0,1 N HCl.  
L-Arginina (pm=210,70): 4 ml de una solución stock 1%.  
D-Biotina (pm=244,30): 1 ml de una solución stock 0,5%.  
Ácido nicotínico (pm=123,10): 1 ml de una solución stock 0,5%.  
Tiamina (pm=337,30): 1 ml de una solución stock 0,5%.  
Glicerol (pm=92,09) (opcional, en sustitución de glucosa): 10 ml de una solución stock 20%.  
L-Metionina (pm=149,20) (opcional): 4 ml de una solución stock 1%.  
L-Cistina (pm=240,30) (opcional): 0,6 ml de una solución stock 8,73%/1 N HCl.  
Ácido lipoico (pm=206,30) (opcional): 0,1 ml de una solución stock 0,005%.  
Acetato sódico (pm=82,03) (opcional): 1ml de una solución stock 32,82%.  
Succinato sódico (pm=270,16) (opcional): 10ml de una solución stock 10,8%.  
Casaminoácidos (20%) (opcional): 10ml.  
Bacto-agar (opcional): 15g.
- Cuando se desea preparar medio mínimo sólido las sales de la solución VB se esterilizan por separado a una concentración 50 veces superior (VBx50). El agar se esteriliza en 955 ml de agua destilada. Una vez enfriado a 50°C se añaden 20 ml de VBx50 (agitando para evitar precipitación de las sales) y los requerimientos correspondientes. Se mezcla bien y se reparte en cajas de Petri a razón de 25ml/caja. Cuando se ha solidificado el medio las cajas se secan boca abajo en una estufa a 37°C durante 48 horas.
  - **Conservación:** El medio mínimo líquido se conserva a 4°C en botes de vidrio. Las cajas de Petri con el medio mínimo sólido se conservan a 4°C boca abajo y dentro de una bolsa de para evitar una deshidratación excesiva.

### Medio mínimo selectivo para mutantes Ara<sup>r</sup>:

- **Uso:** Protocolo de mutagénesis con el ensayo Ara de mutaciones directas.
- **Composición** para 1 litro:
  - Solución salina VBx50: 20ml.
  - L(+)-arabinosa (pm=150,10): 10 ml de una solución stock 20%.
  - Glicerol (pm=92,09): 10 ml de una solución stock 20%.
  - Adenina (pm=171,60): 7,5 ml de una solución stock 1,35%/0,1 N HCl.
  - L-Arginina (pm=210,70): 4 ml de una solución stock 1%.
  - D-Biotina (pm=244,30): 1 ml de una solución stock 0,5%.
  - Ácido nicotínico (pm=123,10): 1 ml de una solución stock 0,5%.
  - Tiamina (pm=337,30): 1 ml de una solución stock 0,5% .
  - L-Metionina (pm=149,20) (opcional): 4 ml de una solución stock 1%.
  - L-Cistina (pm=240,30) (opcional): 0,6 ml de una solución stock 8,73%/1 N HCl.
  - Bacto-agar: 15g.
- Se esteriliza el bacto-agar en 945 ml de agua destilada. Una vez enfriado a 50°C se añaden 20 ml de VBx50 (agitando para evitar precipitación de las sales) y los requerimientos correspondientes. Se mezcla bien y se reparte en cajas de Petri a razón de 25ml/caja. Cuando se ha solidificado el medio las cajas se secan boca abajo en una estufa a 37°C durante 48 h.
- **Conservación:** A 4°C boca abajo y dentro de una bolsa de plástico para evitar deshidratación excesiva. No se deben usar cajas con más de dos semanas.

### ***III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

### III.1. MUTANTES NULOS EN TIORREDOXINA Y/O GLUTARREDOXINA

#### III.1.1. Construcción de la estirpe UC518 portadora de la mutación $\Delta trxA$ (Figura 16)

En *Escherichia coli* se han aislado varios mutantes nulos en el gen que codifica la tiorredoxina (*trxA*). Dos de las mutaciones *trxA*<sup>-</sup> son directamente seleccionables al estar el gen interrumpido por otros que confieren resistencia a antibióticos (tetraciclina o kanamicina) (Fuchs *et al.*, 1983; Russel y Model, 1984). Sin embargo, estas mutaciones no resultaban útiles en este trabajo que pretendía, entre otros objetivos, la construcción de estirpes con deficiencias múltiples. Por ello se eligió la mutación  $\Delta trxA$  consistente en una delección que abarca todo el gen salvo los últimos 23 pares de bases (Russel y Model, 1986).

Al no ser la delección  $\Delta trxA$  seleccionable, se construyó la estirpe intermedia (UC596) por transferencia mediante transducción con el fago P1 del gen *metE163::Tn10* que se localiza cercano al gen de la tiorredoxina, en el minuto 86. Como donadora en esta construcción se utilizó la estirpe K732 y como receptora la estirpe A307 ( $\Delta trxA$ ) (Tabla 2, pág. 51). Los transductantes se seleccionaron por resistencia a tetraciclina (Tn10), comprobándose su incapacidad para crecer en medio mínimo con metionina sulfóxido y su resistencia al fago T7, ambas características dependientes de la presencia de tiorredoxina activa. Se eligió al azar uno de estos transductantes y se le denominó UC596.

Posteriormente la estirpe UC596 ( $\Delta trxA$ , *metE163::Tn10*) se usó como donadora en una segunda transducción cuya receptora fue UC1101 (*araD81*,  $\Delta uvrB$ , pKM101), utilizada como parental de todas las construcciones descritas en este trabajo. En esta transducción la delección  $\Delta trxA$  se transfirió por cotransducción con *metE163::Tn10*. Los transductantes se seleccionaron por resistencia a tetraciclina, y adicional incapacidad de crecer en medio mínimo con metionina sulfóxido y resistencia al fago T7. Se eligió al azar uno de estos transductantes y se le denominó UC513. Finalmente se eliminó de la estirpe UC513 ( $\Delta trxA$ , *metE163::Tn10*, *araD81*,  $\Delta uvrB$ , pKM101) la mutación *metE163::Tn10*, seleccionando en medio mínimo revertientes *metE*<sup>+</sup>. Por réplica se comprobó la sensibilidad a tetraciclina, crecimiento en medio mínimo y resistencia al fago T7 de los revertientes. Uno de ellos se denominó UC518 ( $\Delta trxA$ , *araD81*,  $\Delta uvrB$ , pKM101).

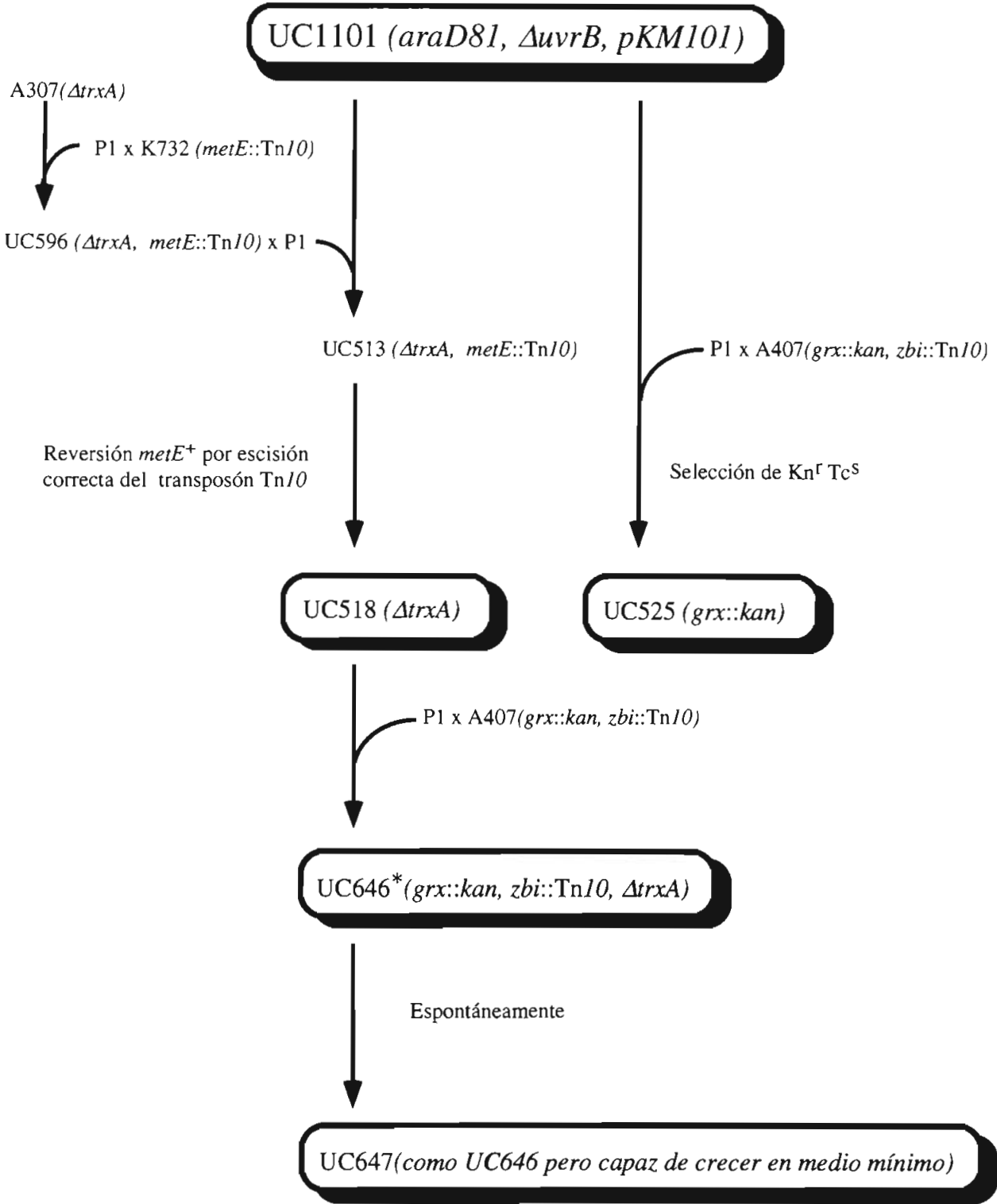


Figura 16. Construcción de estirpes de *E. coli* derivadas de UC1101 deficientes en tiorredoxina y/o glutarredoxina. El asterisco diferencia la estirpe *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* incapaz de crecer en medio mínimo.



### III.1.2. Construcción de la estirpe UC525 portadora de la mutación *grx::kan* (Figura 16)

La mutación *grx::kan* aislada por Russel y Holmgren (1983) se transfirió por transducción con el fago P1 desde A407 (*grx::kan*, *zbi::Tn10*) a la estirpe receptora UC1101. Los transductantes se seleccionaron por resistencia a kanamicina ( $\text{Km}^r$ ). Entre ellos se buscaron sensibles a tetraciclina, para evitar la transferencia simultánea del transposón *Tn10* inserto en un gen próximo desconocido (*zbi::Tn10*). De esta forma se permitía la introducción posterior de otras mutaciones portadoras del transposón *Tn10*. Uno de estos transductantes se denominó UC525.

### III.1.3. Construcción de las estirpes UC646 y UC647 portadoras de las mutaciones *grx::kan* $\Delta\text{trxA}$ (Figura 16)

El mutante doble UC646 se construyó por cotransducción de las mutaciones *grx::kan* y *zbi::Tn10*, desde la estirpe donadora A407 a la receptora UC518 ( $\Delta\text{trxA}$ ). Los transductantes se seleccionaron por resistencia a tetraciclina, y entre ellos se buscaron aquellos que habían adquirido también resistencia a kanamicina. La selección de resistencia a tetraciclina es más fácil por requerir menor tiempo de expresión que la resistencia a kanamicina. Como control se realizó en paralelo la misma transducción usando la estirpe UC1101 (*wt*) como receptora. Los transductantes se seleccionaron tanto en medio rico LB como en medio mínimo. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Con la estirpe UC1101 se obtuvo un número similar de transductantes  $\text{Tc}^r$  en ambos medios, y parecida frecuencia de cotransducción  $\text{Tc}^r$ ,  $\text{Km}^r$ . En cambio, cuando se usó UC518 ( $\Delta\text{trxA}$ ) como receptora, el número de transductantes  $\text{Tc}^r$  fue sólo un 32% con respecto al silvestre en medio rico y un 4% en medio mínimo.

Datos similares fueron previamente descritos por Russel y Holmgren (1988) y reflejan las dificultades metabólicas de los mutantes dobles *grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup>*. Sin embargo nuestros resultados difirieron de los de Russel y Holmgren (1988) en cuanto estos autores encontraron una frecuencia de cotransducción  $\text{Tc}^r$   $\text{Km}^r$  muy baja en medio rico, o nula en medio mínimo. En nuestro caso, aunque ninguno de los cuatro transductantes  $\text{Tc}^r$  seleccionados en medio mínimo había adquirido resistencia a kanamicina ( $\text{Km}^r$ ), se encontró en medio rico una frecuencia muy alta de  $\text{Tc}^r$   $\text{Km}^r$ , equivalente a la del silvestre (84%). Estos datos sugieren diferencias

**Tabla 5. Eficiencia de la transducción de las mutaciones *grx::kan* y *zbi::Tn10* en distintas estirpes receptoras y frecuencia de cotransducción  $Tc^r$   $Kn^r$  (a).**

Estirpe receptora	Medio de selección	n° de colonias	
		$Tc^r$	$Tc^r$ , $Kn^r$ (%)
UC1101 ( <i>wt</i> )	medio rico LB	79	60 (76)
	medio mínimo	102	84 (82)
UC518 ( $\Delta trxA$ )	medio rico LB	25	21 (84)
	medio mínimo	4	0 (0)

<sup>a</sup> Los datos representan la suma de dos transducciones independientes.

importantes entre el fondo genético de nuestro parental UC1101 y la estirpe K38 utilizada por Russel y Holmgren (1988). Uno de los cotransductantes  $Tc^r$   $Kn^r$  se denominó UC646. La estirpe UC646 fue incapaz de crecer en medio mínimo, al igual que el resto de los cotransductantes  $Tc^r$   $Kn^r$ .

A partir de UC646 se obtuvo un derivado capaz de crecer en medio mínimo de la forma siguiente: 0,05 ml de un cultivo estacionario en LB líquido de UC646 se reinoculó en 5 ml de medio mínimo líquido, alcanzándose tras dos días de incubación el estado estacionario. A continuación se sembraron ~1000 bacterias en cajas de medio mínimo, aislándose colonias a los dos días de incubación a 37°C. Por replicación se comprobó que estas bacterias capaces de crecer en cajas de medio mínimo, mantenían la resistencia a los antibióticos tetraciclina y kanamicina, así como al fago T7. Uno de estos derivados se denominó UC647. Sembrando con diferentes factores de dilución bacterias procedentes de un cultivo estacionario en medio rico, se estimó en  $\sim 10^{-4}$  la capacidad de UC646 de generar bacterias capaces de crecer en cajas de medio mínimo. Esta es la primera vez que ha sido posible el aislamiento de una estirpe deficiente en tiorredoxina y glutarredoxina capaz de crecer en cajas de medio mínimo. Las diferencias metabólicas entre UC646 y su derivada UC647 serán objeto de estudio y discusión a lo largo de este trabajo. A partir de este momento se indicará con un asterisco la estirpe *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* incapaz de crecer en medio mínimo.

### III.1.4. Crecimiento de las estirpes derivadas de UC1101 en distintos tipos de medio

#### *Crecimiento en cajas*

Todas las estirpes mostraron idéntica capacidad para formar colonias en cajas de medio rico LB. No obstante, los mutantes dobles  $grx^-trx^-$  (UC646 y UC647) formaron colonias algo más pequeñas que las restantes estirpes tras 24 horas de incubación a 37°C (Tabla 6).

En cajas de medio mínimo se observaron diferencias en cuanto a la capacidad de crecimiento de las distintas estirpes derivadas de UC1101 (Tabla 6). Las estirpes UC1101 (*wt*) y UC525 ( $grx^-$ ) originaron colonias de tamaño normal tras 24 horas de incubación a 37°C. Sin embargo, las estirpes deficientes en tiorredoxina (UC518 y UC647) necesitaron 48 horas para alcanzar un tamaño similar al de UC1101 y UC525. Este resultado concuerda con datos previos que indicaban que la deficiencia en tiorredoxina provoca un incremento del tiempo de generación (Holmgren *et al.*, 1978). De los dobles mutantes  $grx^-trx^-$  sólo UC647 fue capaz de formar colonias en cajas de medio mínimo.

La presencia de metionina mejoró claramente el crecimiento de las estirpes  $trx^-$ , aunque se apreciaron diferencias entre el mutante simple UC518 ( $trx^-$ ), que dio colonias de tamaño normal a las 24 horas, el doble mutante UC647 ( $grx^-trx^-$ ), que aunque mejoró algo su crecimiento requirió 48 horas para formar colonias de un tamaño similar al silvestre, y el doble mutante UC646 ( $grx^-trx^-*$ ), que formó colonias pequeñas a las 48 horas. Finalmente cuando se suplementó el medio mínimo con cistina todas las estirpes crecieron de forma similar siendo suficiente 24 horas de incubación para dar colonias de tamaño normal. En base a estos resultados, se concluyó que la presencia de cistina equiparaba el crecimiento de las distintas estirpes.

El hecho de que nuestros mutantes dobles (UC646 y UC647) sean capaces de crecer en cajas de medio mínimo sin suplementar (UC647) o suplementado con metionina o cistina (UC646) concuerda con la idea de que tiorredoxina y glutarredoxina no son esenciales en la reducción de ribonucleótidos (Russel y Holmgren, 1988), y apoya la propuesta de la existencia de un donador de electrones alternativo de la RDRasa, distinto de la Trx y Grx.

Tabla 6. Efecto de la adición de metionina o cistina sobre el crecimiento en cajas de medio mínimo de las estirpes derivadas de UC1101a.

Estirpe	Tiempo de incubación (horas)	LB <sup>b</sup>	Medio mínimo		
			Sin adiciones	+ Metionina	+ Cistina
<i>wt</i> (UC1101)	24	922	1.244 ± 13	1.114 ± 24	1.167 ± 86
	48		--	--	--
<i>trx</i> <sup>-</sup> (UC518)	24	1.068	--	1.245 ± 74	1.096 ± 132
	48		1.147 ± 39	--	--
<i>grx</i> <sup>-</sup> (UC525)	24	1.165	1.365 ± 46	1.157 ± 58	1.302 ± 129
	48		--	--	--
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> * (UC646)	24	918	--	--	904 ± 26
	48		--	830 ± 13 <sup>c</sup>	--
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> (UC647)	24	794	--	--	815 ± 81
	48		778 ± 80	860 ± 31	--

<sup>a</sup> Bacterias procedentes de cultivos en fase estacionaria (12 h en medio rico LB a 37°C y 90 rpm, excepto los mutantes dobles que se crecieron 16 h), centrifugadas y resuspendidas en tampón VB se sembraron en cajas de medio rico LB o medio mínimo con los suplementos que se indican. Los datos representan la media ± SD de 3 cajas. El asterisco diferencia la estirpe *grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup> incapaz de crecer en medio mínimo.

<sup>b</sup> El número de colonias en cajas de medio rico LB se indica como referencia.

<sup>c</sup> Colonias de tamaño inferior al normal.

Crecimiento en medio líquido

La Tabla 7 muestra los tiempos de generación de las distintas estirpes en medio líquido. En medio rico LB no se apreciaron grandes diferencias, aunque los mutantes crecieron algo peor que el parental silvestre. No obstante las estirpes mostraron marcadas diferencias en su crecimiento en medio mínimo. Como se mencionó anteriormente, y de acuerdo con datos previos (Holmgren *et al.*, 1978), la deficiencia en Tiorredoxina incrementó 1,5 veces el tiempo de generación, mientras que la deficiencia en glutarredoxina no tuvo efecto relevante. Es destacable que el doble mutante UC647, que forma colonias en cajas de medio mínimo, no creció sin embargo en medio líquido.

**Tabla 7. Tiempo de generación en medio líquido de las estirpes derivadas de UC1101<sup>a</sup>.**

Estirpe	Medio rico	Medio mínimo		
	Sin adiciones	Sin adiciones	+ Metionina	+ Cistina
<i>wt</i> (UC1101)	24 ± 1 (n=10)	79 ± 7 (n=12)	67 ± 6 (n=9)	96 ± 9 (n=11)
<i>trx</i> <sup>-</sup> (UC518)	29 ± 1 (n=6)	119 ± 7 (n=4)	77 ± 4 (n=5)	87 ± 5 (n=6)
<i>grx</i> <sup>-</sup> (UC525)	31 ± 0 (n=2)	82 ± 8 (n=3)	78 ± 1 (n=3)	98 ± 3 (n=2)
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> (UC647)	30 ± 2 (n=2)	--	--	163 ± 18 (n=2)

<sup>a</sup> Cultivos estacionarios en medio rico LB se centrifugaron y resuspendieron en tampón VB. Alícuotas de 0,05 ml se inocularon en 10 ml de los medios referidos en la Tabla. Las bacterias se crecieron hasta la fase estacionaria. Los números de la Tabla representan la media ± SD del tiempo de generación estimado en *n* experimentos independientes.

Todas las estirpes mejoraron su crecimiento en presencia de metionina, salvo el doble mutante que tampoco creció en estas condiciones. Sólo la cistina permitió el crecimiento de la estirpe UC647, aunque su tiempo de generación casi duplicó el del tipo silvestre en el mismo medio. Es de destacar que la cistina empeoró el crecimiento del silvestre y del mutante *grx*<sup>-</sup>, mejorando no obstante el crecimiento de la estirpe *trx*<sup>-</sup>, aunque sólo en referencia al medio mínimo sin suplementar. El doble mutante UC646 (*grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup>\*) incapaz de formar colonias en cajas de medio mínimo, presentó en medio líquido con cistina un crecimiento mucoso que impidió la cuantificación de su tiempo de generación.

Tiorredoxina y glutarredoxina son los dos únicos donadores de electrones descritos de la enzima PAPS reductasa (Tsang, 1981) (ver Figura 3 pág. 7). El menor crecimiento del mutante *trx*<sup>-</sup> en comparación con el silvestre y la estirpe *grx*<sup>-</sup>, podría explicarse suponiendo que la tiorredoxina juega un papel más importante que la glutarredoxina en la ruta de reducción de sulfato a cisteína. La adición de metionina al medio mínimo mostró un efecto positivo mayor sobre el

crecimiento del mutante *trx<sup>-</sup>* que sobre el de las otras dos estirpes. Esto podría explicarse admitiendo en *E. coli* la existencia de una vía de conversión de metionina en cisteína, similar a la descrita en organismos eucarióticos (Russel *et al.*, 1990).

El grupo SH de la cisteína confiere a este aminoácido un cierto efecto tóxico, por su capacidad, entre otras cosas, de generar especies activas de oxígeno (Viña *et al.*, 1983), hecho que justifica la elección de cistina como fuente exógena de azufre orgánico reducido. No obstante hay que tener presente que la reducción del puente disulfuro de la cistina puede alterar el estado redox intracelular, lo que explicaría el efecto negativo de la adición al medio de este aminoácido sobre el crecimiento del tipo silvestre y del mutante glutarredoxina. En el mutante *trx<sup>-</sup>*, este cierto efecto negativo sólo se observó en relación al crecimiento en metionina, pero no en relación al medio mínimo sin suplementar, posiblemente por lo especulado en el párrafo anterior sobre el papel predominante de la tiorredoxina en la reducción de sulfato.

El crecimiento del doble mutante UC647 sólo fue factible en medio líquido en presencia de cistina. La reducción de ésta generaría cisteína compensando el posible bloqueo de la ruta de reducción de sulfato en dicho mutante por la ausencia simultánea de tiorredoxina y glutarredoxina. No obstante hay que recordar que la estirpe UC647 se aisló como capaz de formar colonias en cajas de medio mínimo, lo que sugiere la existencia de un tercer donador de electrones para la PAPS reductasa, el cual podría ser el mismo que el postulado para la RDRasa (Russel *et al.*, 1990). Las diferencias encontradas entre el crecimiento en medio mínimo líquido y en cajas podrían deberse a la mayor aireación a que se ven sometidas las células en medio líquido, lo que provocaría que éstas se encontrasen en un estado más oxidado que en las condiciones semiaeróbicas de crecimiento en caja. La capacidad de UC647 de formar colonias en cajas de medio mínimo sin suplementar demuestra que la deficiencia simultánea de tiorredoxina y glutarredoxina no conduce inevitablemente a la muerte celular por intoxicación con PAPS, en contra de lo argumentado por otros autores (Russel *et al.*, 1990).

### *Crecimiento en cajas de medio mínimo selectivo*

Uno de los objetivos de este trabajo es la construcción de estirpes bacterianas deficientes en tiorredoxina y/o glutarredoxina, en un fondo genético

especialmente diseñado para estudios de mutagénesis. El fondo genético escogido fue el de la estirpe UC1101 que permite cuantificar la respuesta mutagénica en base al número de colonias en cajas de medio mínimo con arabinosa y glicerina (mutantes Ara<sup>r</sup>). Por ello se investigó el crecimiento en cajas de medio mínimo selectivo de las diferentes estirpes derivadas de UC1101 (Tabla 8).

De forma similar a lo ya comentado con respecto al crecimiento en cajas de medio mínimo sólo los mutantes Ara<sup>r</sup> procedentes del tipo silvestre (UC1101) y del *grx*<sup>-</sup> (UC525) fueron capaces de crecer normalmente en cajas de medio selectivo sin suplementar a las 72 h (tiempo estándar de incubación de las cajas en el ensayo Ara de mutagénesis). En contraposición las estirpes que carecen de tiorredoxina presentaron problemas de crecimiento en este medio. UC518 (*trx*<sup>-</sup>) originó colonias Ara<sup>r</sup> pequeñas a las 72 h. Cuando esta deficiencia en tiorredoxina se combinó con la deficiencia en glutarredoxina, o bien no había crecimiento (UC646, *grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup>\*) o bien las colonias Ara<sup>r</sup> eran diminutas (UC647, *grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup>). La adición de metionina al medio selectivo mejoró el crecimiento de las estirpes *trx*<sup>-</sup>, siendo las colonias Ara<sup>r</sup> derivadas de las estirpes UC518 (*trx*<sup>-</sup>) y UC647 (*grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup>) de tamaño similar a las del tipo silvestre. UC646 (*grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup>\*) tras 72 h de incubación a 37°C sólo originó colonias diminutas. La adición de cistina al medio selectivo equiparó el tamaño de las colonias mutantes Ara<sup>r</sup>.

Estos resultados coinciden plenamente con los descritos respecto al crecimiento en cajas de medio mínimo aconsejando la adición de cistina a las cajas de medio selectivo para los ensayos de mutagénesis.

### III.1.5. Respuesta mutagénica de las estirpes derivadas de UC1101

#### *Frecuencia de mutación espontánea*

Los resultados de la Tabla 8 sugieren un número mayor de mutantes espontáneos Ara<sup>r</sup> en estirpes deficientes en tiorredoxina y/o glutarredoxina. Por ello se decidió analizar la tasa de mutación espontánea en diversos cultivos de UC1101 y sus estirpes derivadas (Tabla 9). La deficiencia en tiorredoxina aumentó la tasa de mutación espontánea 2,14 veces con respecto a la del silvestre. El efecto de la deficiencia en glutarredoxina fue considerablemente menor, 1,23 veces con respecto al silvestre. En los dobles mutantes, UC646 y UC647, la tasa

de mutación espontánea se incrementó ~2,4 veces, de forma que el efecto de la doble deficiencia parece ser aditivo con respecto al de las mutaciones simples.

**Tabla 8. Efecto de la adición de metionina o cistina sobre el crecimiento en cajas de medio mínimo selectivo de los mutantes Ara<sup>r</sup> procedentes de las estirpes derivadas de UC1101<sup>a</sup>.**

Estirpe	Medio mínimo		
	Sin adiciones	+ Metionina	+ Cistina
<i>wt</i> (UC1101)	246 ± 29	276 ± 15	297 ± 31
<i>trx</i> <sup>-</sup> (UC518)	499 ± 28 <sup>b</sup>	553 ± 55	659 ± 64
<i>grx</i> <sup>-</sup> (UC525)	523 ± 39	450 ± 21	501 ± 13
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> * (UC646)	--	145 ± 21 <sup>c</sup>	360 ± 14
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> (UC647)	198 ± 14 <sup>c</sup>	457 ± 28	600 ± 35

<sup>a</sup> Bacterias (~ 10<sup>7</sup>) procedentes de cultivos en fase estacionaria (12 h en medio rico LB a 37°C y 90 rpm, excepto los mutantes dobles que se crecieron 16 h), centrifugadas y resuspendidas en tampón VB, se sembraron en cajas selectivas de mutantes Ara<sup>r</sup> con los suplementos que se indican. Las cajas se incubaron 72 h. Los datos representan la media ± SD del número de colonias Ara<sup>r</sup> de 3 cajas. El asterisco diferencia la estirpe *grx*<sup>-</sup> *trx*<sup>-</sup> incapaz de crecer en medio mínimo.

<sup>b</sup> Colonias de tamaño inferior al normal.

<sup>c</sup> Colonias diminutas.

Las distintas tasas de mutación espontánea podrían ser explicadas por una mayor importancia de la tiorredoxina frente a la glutaredoxina en la capacidad de reducir ribonucleótidos, ligada a la síntesis de ADN (replicación y reparación). Como se mostrará más adelante (Tabla 15 pág. 104), extractos acelulares de UC518 carentes de Trx reducen ribonucleótidos con mucha menor eficiencia que extractos de UC525, deficientes en Grx. A su vez, extractos acelulares de UC647, que carece de ambas proteínas, son aún menos eficientes en dicho proceso.



**Tabla 9. Tasa de mutantes espontáneos Ara<sup>r</sup> en cajas de medio mínimo selectivo suplementado con cistina de las estirpes derivadas de UC1101<sup>a</sup>.**

Estirpe	Mutantes Ara <sup>r</sup> espontáneos	nº de veces
<i>wt</i> (UC1101)	258 ± 46 (27)	1,00
<i>trx</i> <sup>-</sup> (UC518)	551 ± 246 (25)	2,14
<i>grx</i> <sup>-</sup> (UC525)	318 ± 59 (22)	1,23
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> * (UC646)	625 ± 238 (19)	2,42
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> (UC647)	614 ± 168 (21)	2,38

<sup>a</sup> Bacterias (~ 10<sup>7</sup>) procedentes de cultivos en fase estacionaria (12 h en medio rico LB a 37°C y 90 rpm, excepto los mutantes dobles que se crecieron 16 h), centrifugadas y resuspendidas en tampón VB, se sembraron en cajas selectivas de mutantes Ara<sup>r</sup> suplementadas con cistina. Las cajas se incubaron 72 h. Los datos representan la media ± SD de la tasa de mutantes espontáneos estimada en *n* experimentos independientes. El asterisco diferencia la estirpe *grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup> incapaz de crecer en medio mínimo.

### ***Respuesta mutagénica a agentes genotóxicos***

Tiorredoxina y glutarredoxina son hasta el momento los dos únicos donadores de electrones conocidos para la ribonucleótido reductasa, aunque no está aún claro cómo estirpes deficientes en ambas proteínas sintetizan desoxirribonucleótidos para la replicación y reparación del ADN. Una vez que se demostró la posibilidad de aislar dobles mutantes *grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup> capaces de crecer en medio mínimo y sin alteraciones fenotípicas importantes (excepto un crecimiento más lento en medio mínimo atribuible mayoritariamente a la deficiencia en tiorredoxina) se investigaron posibles diferencias entre las estirpes por exposición a agentes que dañan el ADN.

El crecimiento en cajas de medio mínimo selectivo sugería la adición de cistina como la mejor forma de igualar el crecimiento entre todas las estirpes. No obstante, pareció oportuno estudiar la respuesta a un mutágeno (MNNG) en cajas suplementadas con cistina en comparación con metionina (Tabla 10). En todos los casos la respuesta en medio con cistina fue superior a la obtenida en presencia de metionina. La mayor respuesta mutagénica en presencia de cistina podría deberse en parte al hecho de que la MNNG es activada por glutatión (Lawley y Thatcher, 1970; Kerklaan *et al.*, 1983) y en consecuencia quizás por otros tioles como la cisteína, su precursor y un producto de la reducción de la cistina. No obstante, este efecto, como máximo, podría explicar las diferencias encontradas en el tipo silvestre ( $\times 1,86$ ) y en la estirpe *grx*<sup>-</sup> ( $\times 1,61$ ), pero no las diferencias mayores observadas en las estirpes *trx*<sup>-</sup> y *grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup> ( $\times 2,94$  y  $\times 4,34$ , respectivamente). En estos dos últimos casos las diferencias se explicarían, al menos en parte, por el mejor crecimiento de estas bacterias en cajas con cistina frente a cajas suplementadas con metionina. Tanto la inducción de lesiones en el ADN como su fijación en mutaciones es tanto mayor cuantas más generaciones ocurren en cajas de medio selectivo (Ruiz-Rubio *et al.*, 1984; Pueyo y Ruiz-Rubio, 1984). En base a este resultado los restantes experimentos de mutagénesis se realizaron en cajas suplementadas con cistina.

El estudio comparativo de la respuesta mutagénica se realizó con seis agentes que difieren en sus mecanismos de acción mutagénica (Tabla 1, pág. 51): EMS (etilante), MNNG (metilante, activado por GSH), DBE (dihaloalcano, activado por GSH), 4NQO (radiomimético), luz UV (mutágeno dependiente de SOS) y *t*-butil-OOH (oxidante). En primer lugar se compararon las respuestas mutagénicas de los dos dobles mutantes, UC646 (*grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup>\*) y UC647 (*grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup>). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11 e indican un comportamiento similar de ambas estirpes, por lo que las restantes comparaciones con los mutantes simples y el tipo silvestre se hicieron sólo con la estirpe UC647 que crece en medio mínimo sin suplementar.

La Figura 17 muestra los resultados de un experimento representativo en el que comparativamente se analizó en todas las estirpes la respuesta a la acción letal y mutagénica a dosis crecientes de uno de los agentes mutagénicos utilizados (MNNG). No se apreciaron diferencias marcadas entre el tipo silvestre y los mutantes *trx*<sup>-</sup>, *grx*<sup>-</sup> y *grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup> respecto a la acción letal y mutagénica de este mutágeno. Como control se incluyó una estirpe deficiente en GSH y otra deficiente en las alquiltransferasas codificadas por el gen inducible *ada* y el

Tabla 10. Respuesta mutagénica a MNNG en cajas de medio mínimo selectivo suplementado con cistina o metionina de las estirpes derivadas de UC1101<sup>a</sup>.

MNNG (nmol/plate)	<i>w</i> <sup>+</sup> (UC1101)		<i>trx</i> <sup>-</sup> (UC518)		<i>grx</i> <sup>-</sup> (UC525)		<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> (UC647)	
	Met	Cis	Met	Cis	Met	Cis	Met	Cis
0	257	251	444	490	411	311	573	542
5	602	927	596	822	857	1164	670	1188
10	837	1468	769	1318	148	2105	784	1251
25	1.862	4.169	1.334	2.822	3.930	5.617	1.243	4.370
50	4.124	7.265	2.077	5.264	5.897	9.304	2.178	7.459
75	4.328	7.435	2.843	5.801	7.493	10.092	2.467	8.332
100	4.652	9.935	3.599	6.432	9.678	12.616	3.196	7.516
<i>Mutantes Ara</i> /mmol	77 (1,00)	143 (1,86)	33 (1,00)	97 (2,94)	114 (1,00)	184 (1,61)	33 (1,00)	144 (4,34)

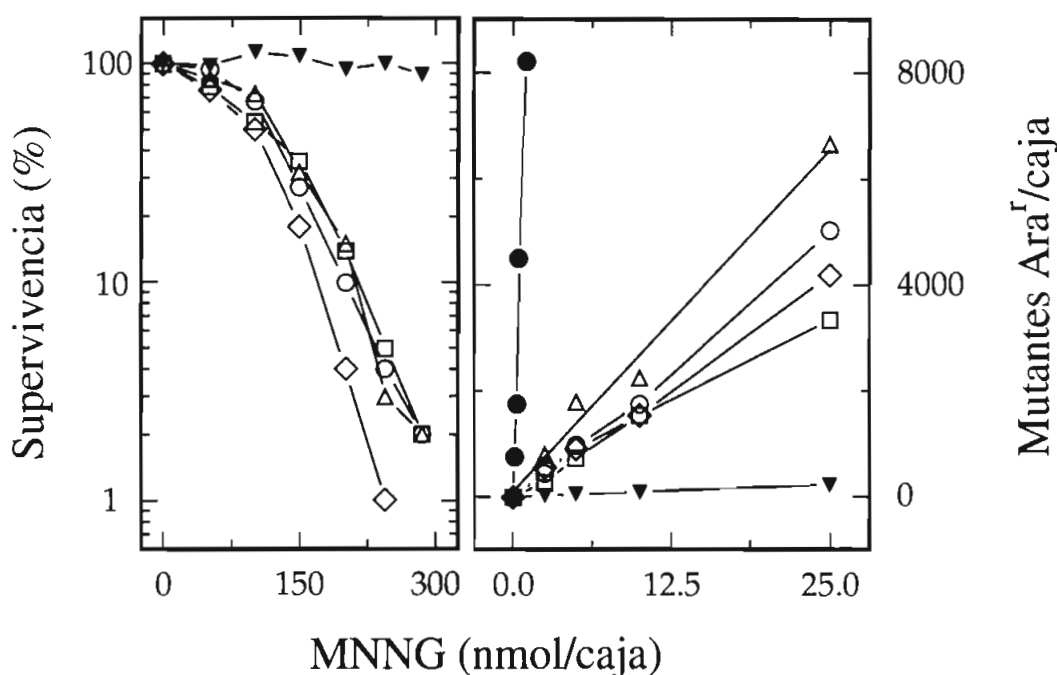
<sup>a</sup> Los datos representan el número de mutantes *Ara*/caja (media de 2 cajas). La potencia mutagénica se expresa como mutantes *Ara*/mmol de MNNG, y corresponde a la pendiente de la curva dosis-respuesta estimada a partir de la porción lineal de la misma. Entre paréntesis se indica el cociente entre la potencia mutagénica de cada estirpe en medio selectivo suplementado con cistina y la potencia en medio selectivo suplementado con metionina.

**Tabla 11. Comparación de la respuesta mutagénica de las estirpes UC646 y UC647<sup>a</sup>.**

Compuesto	<i>grx<sup>-</sup> trx<sup>-*</sup></i> (UC646)	<i>grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup></i> (UC647)	Compuesto	<i>grx<sup>-</sup> trx<sup>-*</sup></i> (UC646)	<i>grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup></i> (UC647)
MNNG (nmoles)			EMS (nmoles)		
0	579	582	0	568	565
5	1.130	1.094	1.000	1.400	1.480
10	1.568	1.619	2.500	2.772	2.705
25	2.459	3.448	5.000	4.095	5.055
50	5.045	5.347			
DBE (nmoles)			<i>t</i> -Butil-OOH (nmoles)		
0	471	525	0	609	628
1.000	556	646	100	1.102	1.009
2.000	702	935	250	1.375	1.120
5.000	806	1.075	500	1.697	1.357
7.500	1.053	1.377	1.000	1.729	1.880
4-NQO (nmoles)			Luz UV (J/m <sup>2</sup> )		
0	578	635	0	521	470
0,10	982	980	0,10	1.037	1.109
0,25	1.586	1.822	0,25	2.293	3.001
0,50	2.806	3.168	0,50	3.891	3.852
1,00	4.137	4.936	1,00	5.028	5.820

<sup>a</sup> Los datos representan el número de mutantes Ara<sup>r</sup>/caja (media de 2 cajas) en un experimento representativo. El asterisco diferencia la estirpe *grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup>* incapaz de crecer en medio mínimo.

constitutivo *ogt*. De acuerdo con lo esperado, la estirpe *gsh<sup>-</sup>* resultó insensible a la acción de MNNG (Sedgwick y Robins, 1980) dado que este compuesto se activa en presencia de glutatión reducido. Por el contrario, la estirpe *ada<sup>-</sup>ogt<sup>-</sup>* resultó hipermutable a la acción mutagénica de la MNNG, de acuerdo con el papel reparador de estas proteínas sobre el principal aducto mutagénico, O<sup>6</sup>-metilguanina (Abril *et al.*, 1992).



**Figura 17.** Supervivencia y mutantes  $Ara^+$  inducidos por MNNG en las estirpes de *E. coli* derivadas de UC1101.  $\circ$  UC1101 (*wt*),  $\square$  UC518 (*trx*<sup>-</sup>),  $\Delta$  UC525 (*grx*<sup>-</sup>),  $\diamond$  UC647 (*grx*<sup>-</sup> *trx*<sup>-</sup>),  $\bullet$  UC2109 (*ada*<sup>-</sup> *ogt*<sup>-</sup>),  $\blacktriangledown$  UC1105 (*gshA*<sup>-</sup>).

La Tabla 12 muestra las relaciones dosis-respuesta de un experimento representativo para cada uno de los compuestos. Cada experimento se repitió varias veces; las medias  $\pm$  SD de las potencias mutagénicas de las diferentes repeticiones se recogen en la Tabla 13. En las condiciones experimentales empleadas, con una supervivencia celular del 100% (resultados no mostrados), no se detectaron claras diferencias en la respuesta mutagénica de las cuatro estirpes, ni siquiera respecto al doble mutante UC647. Únicamente las estirpes deficientes en tiorredoxina resultaron algo menos sensibles a la mutagénesis que sus correspondientes parentales: UC518 (*trx*<sup>-</sup>) vs UC1101 (*wt*) ó UC647 (*grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup>) vs UC525 (*grx*<sup>-</sup>). Este efecto, como se comentó anteriormente, puede atribuirse a la menor tasa de crecimiento de las estirpes *trx*<sup>-</sup> con respecto a las *trx*<sup>+</sup>.

En resumen, estos resultados sugieren que las estirpes, *trx*<sup>-</sup>, *grx*<sup>-</sup> e incluso los dobles mutantes *grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup>, tienen una síntesis balanceada de desoxirribonucleótidos similar a la del tipo silvestre, bajo condiciones de estrés (exposición a mutágenos) que estimulan la producción de los mismos (Kunz y Kohalmi, 1991). Este resultado de nuevo refuerza la idea de que Trx y Grx no son esenciales para la síntesis de desoxirribonucleótidos y, por tanto, la existencia de un tercer donador de electrones para la ribonucleótido reductasa (Russel *et al.*, 1990).

**Tabla 12. Respuesta mutagénica de las estirpes derivadas de UC1101.**

Compuesto	Dosis	<i>wt</i> (UC1101)	<i>trx</i> <sup>-</sup> (UC518)	<i>grx</i> <sup>-</sup> (UC525)	<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> (UC647)
MNNG (nmoles)	0	192	484	316	570
	2,5	631	761	1.107	1.124
	5,0	1.150	1.222	2.114	1.467
	10,0	1.956	2.015	4.552	2.112
	25,0	5.207	3.828	6.955	4.764
EMS (nmoles)	0	270	678	362	755
	1.000	1.394	1.777	1.619	1.735
	2.500	2.904	3.720	3.534	3.560
	5.000	5.440	5.957	6.687	6.779
DBE (nmoles)	0	250	410	330	571
	1.000	446	524	561	633
	2.000	668	710	746	780
	5.000	1.251	1.103	1.365	997
	7.500	1.497	1.322	1.677	1.386
<i>t</i> -Butil-OOH (nmoles)	0	215	468	367	590
	100	629	792	827	946
	250	861	1.000	1.295	1.033
	500	1.080	1.103	1.623	1.323
	1.000	1.351	1.489	2.135	1.571
4-NQO (nmoles)	0	268	440	342	484
	0,10	1.435	939	1.389	842
	0,25	2.628	1.698	2.550	1.302
	0,50	5.729	3.382	5.749	2.507
	1,00	8.932	6.806	9.824	5.945
Luz UV (J/m <sup>2</sup> )	0	269	621	322	671
	0,10	1.036	1.180	1.266	1.154
	0,25	2.836	2.681	3.145	2.402
	0,50	4.608	4.274	5.869	3.801
	1,00	7.809	6.718	9.736	5.325

<sup>a</sup> Los datos representan el número de mutantes Ara<sup>r</sup>/caja (media de 2 cajas) en un experimento representativo.

**Tabla 13. Potencia mutagénica de distintos agentes en las estirpes derivadas de UC1101<sup>a</sup>.**

Compuesto (n)	<i>wt</i> (UC1101)	<i>trx</i> <sup>-</sup> (UC518)	<i>grx</i> <sup>-</sup> (UC525)	<i>trx</i> <sup>-</sup> <i>grx</i> <sup>-</sup> (UC647)
MNNG (3)	192 ± 9	127 ± 5	272 ± 101	143 ± 28
EMS (3)	0,88 ± 0,18	0,88 ± 0,17	1,09 ± 0,16	1,00 ± 0,23
DBE (8)	0,12 ± 0,05	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,05	0,09 ± 0,02
<i>t</i> -Butil-OOH (4)	2,73 ± 0,64	2,15 ± 0,27	3,14 ± 0,92	1,80 ± 0,14
4-NQO (5)	8.157 ± 1.335	5.484 ± 1.335	9.707 ± 1.982	5.358 ± 1.125
UV (2)	9.500 ± 904	8.476 ± 1.375	12.414 ± 961	8.637 ± 3.138

<sup>a</sup> Los datos representan la media ± SD de la potencia mutagénica estimada a partir de *n* experimentos independientes (incluyendo los datos de la Tabla 12). La potencia se expresa como mutantes Ara<sup>r</sup>/dosis de mutágeno y corresponde a la pendiente de la porción lineal de la curva dosis-respuesta.

### III.1.6. Caracterización bioquímica de las estirpes derivadas de UC1101

#### *Niveles de tiorredoxina y glutarredoxina*

Las deficiencias en tiorredoxina y/o glutarredoxina de las estirpes derivadas de UC1101 se confirmaron midiendo la actividad enzimática de ambas proteínas mediante el protocolo de Holmgren (1976), siguiendo su actividad como mediadoras en la reducción de ribonucleótidos en presencia de un exceso de RDRasa (apartado II.3.5. pág. 60). Como se muestra en la Tabla 14 la actividad tiorredoxina fue prácticamente nula en las estirpes con la delección  $\Delta trxA$  (UC518 y UC647). Por el contrario, las estirpes portadoras de la mutación *grx::kan* mantenían una actividad importante de reducción de ribonucleótidos dependiente de GSH. Esta actividad fue del 32% en el mutante simple UC525 (*grx*<sup>-</sup>) y del 14% en el doble mutante UC647 (*grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup>) en relación al tipo silvestre. También destacó un cierto incremento de la actividad tiorredoxina (1,40 veces) en la estirpe *grx*<sup>-</sup> (UC525) y, viceversa, un incremento en la actividad glutarredoxina (1,56 veces) en la estirpe *trx*<sup>-</sup> (UC518).

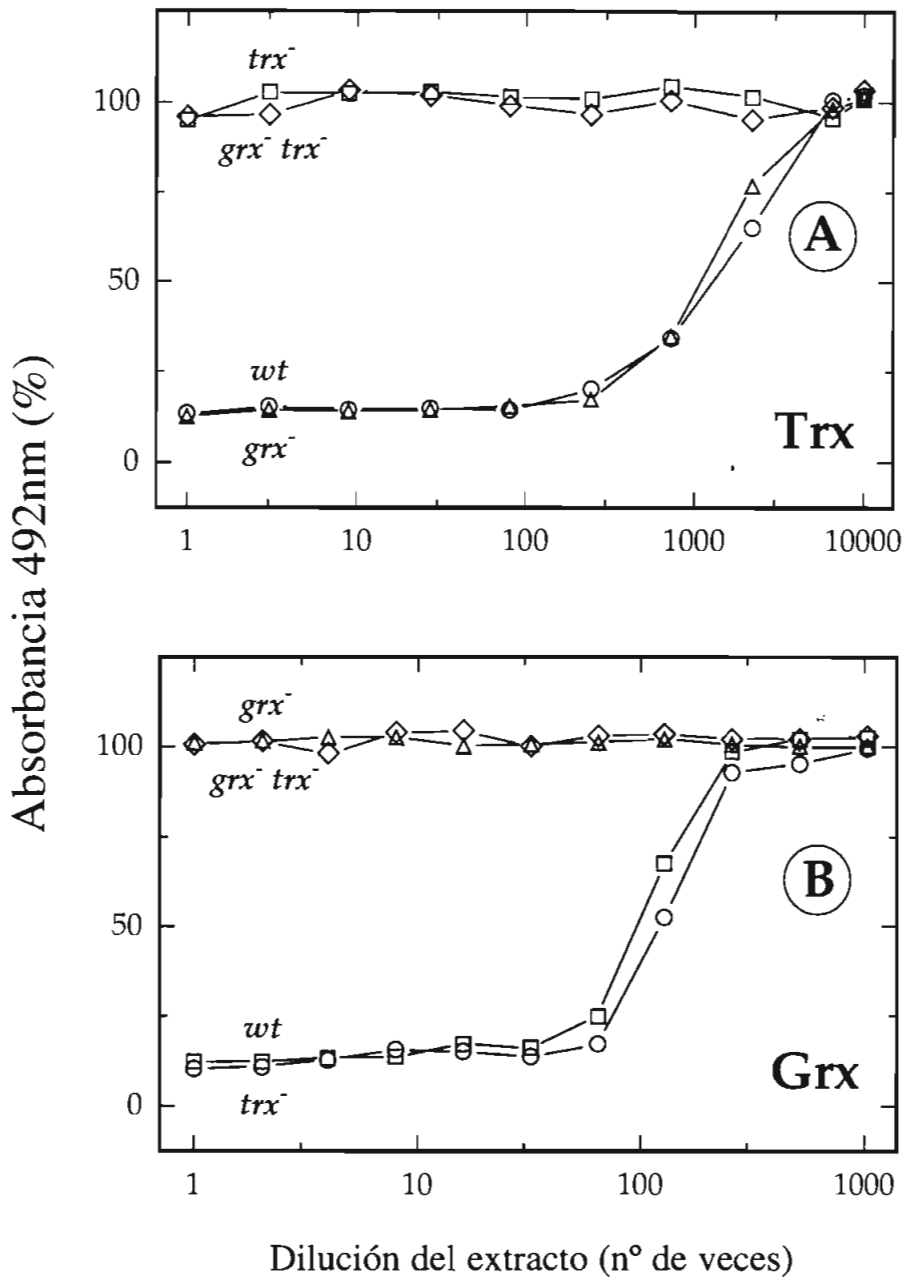
La ausencia de tiorredoxina y glutarredoxina en los mutantes nulos  $\Delta trxA$  y  $grx::kan$  se demostró de forma definitiva mediante inmunoensayos indirectos competitivos (apartado II.3.6. pág.62). Estos nuevos ensayos se desarrollaron como alternativa ventajosa al ya existente, basado en el radioinmunoensayo (Holmgren *et al.*, 1978; Holmgren, 1983; Russel y Holmgren, 1988). La ausencia de tiorredoxina en extractos libres de células de UC518 ( $trx^-$ ) y UC647 ( $grx^- trx^-$ ) se demostró claramente, dado que el anticuerpo primario anti-Trx no fue eliminado por incubación ni siquiera con los extractos sin diluir (Figura 18-A). Como control, los extractos de UC1101 (*wt*) y UC525 ( $grx^-$ ) contenían altas concentraciones de tiorredoxina, requiriéndose diluciones de ellos superiores a 1:5.000 para que el inmunoensayo alcanzase el límite de detección para la tiorredoxina (0,54 ng tiorredoxina/mg proteína). De forma análoga, las estirpes UC525 ( $grx^-$ ) y UC647 ( $grx^- trx^-$ ) carecían completamente de glutarredoxina (límite de detección: 0,96 ng de glutarredoxina/mg proteína), mientras que el nivel de esta proteína era más de doscientas veces superior en UC1101 (*wt*) o UC518 ( $trx^-$ ) (Figura 18-B).

**Tabla 14. Niveles de tiorredoxina y glutarredoxina de las estirpes derivadas de UC1101<sup>a</sup>.**

Estirpe	Tiorredoxina		Glutarredoxina	
	Actividad	ELISA	Actividad	ELISA
<i>wt</i> (UC1101)	81,5 ± 7,2 (1,00)	2.254 ± 397 (1,00)	31,9 ± 10,1 (1,00)	194 ± 47 (1,00)
$trx^-$ (UC518)	0,0 (0,00)	<0,54 (<0,0002)	49,9 ± 14,6 (1,56)	430 ± 22 (2,22)
$grx^-$ (UC525)	114,1 ± 9,4 (1,40)	3.651 ± 214 (1,62)	10,1 ± 3,1 (0,32)	<0,96 (<0,005)
$grx^- trx^-$ (UC647)	0,3 ± 0,2 (0,004)	<0,54 (<0,0002)	4,3 ± 0,8 (0,14)	<0,96 (<0,005)

<sup>a</sup> Las actividades enzimáticas se expresan como nmoles dCDP/20 min x mg proteína, y los resultados de ELISA como ng de tiorredoxina o glutarredoxina/mg proteína total. Entre paréntesis se indica la relación entre los niveles de tiorredoxina o glutarredoxina de cada estirpe y los de la estirpe parental UC1101.





**Figura 18.** Determinación por ELISA de tiorredoxina (A) y glutaredoxina (B) en extractos libres de células de *E. coli* derivadas de UC1101. ○ UC1101 (*wt*), □ UC518 (*trx<sup>-</sup>*), △ UC525 (*grx<sup>-</sup>*), ◇ UC647 (*grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup>*).

Los contenidos en tiorredoxina y glutaredoxina de las estirpes derivadas de UC1101 se determinaron por comparación con curvas patrón obtenidas con cantidades conocidas de estas dos proteínas puras (Tabla 14). El nivel de tiorredoxina de las bacterias *trx<sup>-</sup>* (UC518 y UC647) fue  $<0,0002$  en comparación con el del tipo silvestre UC1101. De la misma forma, el nivel de glutaredoxina en las estirpes *grx<sup>-</sup>* (UC525 y UC647) fue  $<0,005$  frente al del tipo silvestre, por

lo que la capacidad de reducción de ribonucleótidos dependiente de GSH que se observa en las estirpes *grx<sup>-</sup>* no puede ser atribuída a la glutarredoxina.

El inmunoensayo confirmó los resultados de actividad enzimática, demostrando el aumento de tiorredoxina o glutarredoxina en los mutantes *grx<sup>-</sup>* y *trx<sup>-</sup>*, respectivamente (Tabla 14). El mutante UC525 (*grx<sup>-</sup>*) tenía 1,62 veces más tiorredoxina que el tipo silvestre, mientras que la estirpe UC518 (*trx<sup>-</sup>*) mostraba 2,22 veces más glutarredoxina que el parental. Por otra parte, el inmunoensayo mostró que en el tipo silvestre la tiorredoxina era 11,6 veces más abundante que la glutarredoxina, mientras que los ensayos enzimáticos indicaban que la actividad RDRasa dependiente de tiorredoxina era sólo 2,6 veces superior a la dependiente de glutarredoxina. En consecuencia, la glutarredoxina es unas 4,5 (11,6 / 2,6) veces más activa que la tiorredoxina en el ensayo con ribonucleótido reductasa, lo cual está de acuerdo con cálculos previos (Holmgren, 1979a).

### *Capacidad de reducción de ribonucleótidos*

La capacidad endógena de reducir ribonucleótidos de UC1101 y estirpes derivadas se midió en extractos libres de células en ausencia de tiorredoxina, tiorredoxina reductasa y ribonucleótido reductasa añadida (Tabla 15). El mutante *grx<sup>-</sup>* mostró gran capacidad de reducción de ribonucleótidos, 89% de la del tipo silvestre, atribuible a su contenido en tiorredoxina. En comparación, el mutante *trx<sup>-</sup>* mostró sólo un 39% de la actividad del silvestre, lo que confirma la mayor importancia relativa de la Trx como donadora de electrones de la RDRasa. Lo más destacable es que el mutante doble sin tiorredoxina ni glutarredoxina tenía aún un 30% de la actividad del silvestre. Estos resultados confirman datos previos (Russel *et al.*, 1990) que demostraban que la reducción de ribonucleótidos puede ocurrir en ausencia de Trx y Grx, apoyando la existencia de un tercer donador de electrones para la ribonucleótido reductasa.

De hecho, a partir del doble mutante UC647 (*grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>*) se han purificado a homogeneidad dos nuevas glutarredoxinas, denominadas Grx2 y Grx3, que comparten la secuencia de aminoácidos típica del centro activo de las glutarredoxinas (Cys-Pro-Tyr-Cys). Grx2 tiene un tamaño inusual para las glutarredoxinas, 27 kD, y no cede electrones a la RDRasa de *E. coli*. Por el contrario, Grx3, tiene el tamaño típico de las glutarredoxinas, 10 kD, y cede electrones a la RDRasa de *E. coli* con una *K<sub>m</sub>* similar a la de la glutarredoxina ya conocida (0,35  $\mu$ M) pero con una *V<sub>máx</sub>* de sólo un 5%. El descubrimiento de estas

dos nuevas glutarredoxinas conlleva un cambio de nomenclatura, de forma que la primera glutarredoxina descrita pasaría a llamarse Grx1 y las dos nuevas Grx2 y Grx3, respectivamente. Los genes que codifican dichas proteínas serían *grxA*, *grxB* y *grxC*, respectivamente (Åslund *et al.*, 1994).

En conclusión, dadas las características diferenciales de estas dos nuevas glutarredoxinas, la actividad RDRasa dependiente de GSH presente en mutantes nulos *grx::kan* y la capacidad endógena de reducción de ribonucleótidos de tales estirpes debe atribuirse a la Grx3, que se correspondería con el donador alternativo de electrones de la ribonucleótido reductasa postulado anteriormente (Russel y Holmgren, 1988; Russel *et al.*, 1990).

**Tabla 15. Capacidad de reducción de ribonucleótidos en extractos libres de células de las estirpes derivadas de UC1101.**

Estirpe	Extracto (µl)	NADPH	Actividad RDRasa <sup>a</sup>		nº de veces
			dCDP producido	Actividad específica	
Mezcla	0	+	67	0	--
<i>wt</i> (UC1101)	30	-	151		
	30	+	585	0,64	1,00
<i>trx</i> <sup>-</sup> (UC518)	30	-	111		
	30	+	379	0,25	0,39
<i>grx</i> <sup>-</sup> (UC525)	30	-	139		
	30	+	571	0,57	0,89
<i>trx</i> <sup>-</sup> <i>grx</i> <sup>-</sup> (UC647)	30	-	133		
	30	+	311	0,19	0,30

<sup>a</sup> La actividad RDRasa se determinó en presencia de 0,04 ml de mezcla de reacción y 30 µl de extracto en un volumen final de 0,12 ml. La mezcla de reacción contenía 100 mM tampón HEPES (pH 7,6), 6 mM NADPH (cuando se indica), 1,6 mg/ml BSA, 3 mM [<sup>3</sup>H]CDP (64.000 cpm), 4 mM ATP y 32 mM MgCl<sub>2</sub>. La actividad se expresa como pmol dCDP/10 min ó pmol dCDP/10 min x mg proteína (actividad específica). En cursiva se indica la relación entre los niveles de actividad específica RDRasa de cada estirpe y los de la estirpe parental UC1101.

**Actividad ribonucleótido reductasa**

La capacidad endógena de reducción de ribonucleótidos observada en los mutantes *trx<sup>-</sup>*, *grx<sup>-</sup>*, y *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* podría atribuirse no sólo a la participación de la Grx3 sino también a un incremento en la actividad ribonucleótido reductasa. La Tabla 16 muestra los niveles de actividad RDRasa en diversas estirpes de *E. coli*. La proteína RDRasa no pudo determinarse en este trabajo al carecer de los anticuerpos necesarios para llevar a cabo el ELISA. En las estirpes derivadas de UC1101 (+pKM101), la ausencia de tiorredoxina incrementó la actividad RDRasa 3,2 veces respecto al silvestre y la ausencia de glutarredoxina sólo 1,25 veces. Los dobles mutantes *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* mostraron niveles de actividad RDRasa mucho más elevados: el mutante doble que no crece en medio mínimo (UC646) incrementó su actividad 11,6 veces, mientras que su derivado capaz de crecer en medio mínimo (UC647) lo hizo 19,0 veces.

La regulación de la ribonucleótido reductasa de *E. coli* es muy compleja (ver Apartado I.3.1. pág. 25). Compuestos que inhiben la replicación del ADN, mutaciones *dna* condicionales, auxotrofía o ayuno para timina, conllevan una inducción entre 10 y 15 veces de la actividad RDRasa (Filpula y Fuchs, 1977; Hanke y Fuchs, 1983). Esta inducción, que requiere la síntesis de nuevas moléculas de enzima, se debe a un incremento en la transcripción del operón *nrdAB* (Filpula y Fuchs, 1977; Hanke y Fuchs, 1983; 1984). Los incrementos de 11,6 y 19 veces observados en la actividad RDRasa de los mutantes dobles *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* sugieren que el funcionamiento de la ribonucleótido reductasa con donadores de electrones distintos de la tiorredoxina y la Grx1 conlleva alteraciones similares a los producidos por tratamientos que bloquean drásticamente la síntesis de ADN. En la actualidad se están llevando a cabo investigaciones para determinar si los incrementos de RDRasa observados se deben a una inducción de la transcripción de los genes *nrd*. La estirpe parental UC1101, concebida para estudios de mutagénesis (Abril y Pueyo, 1990), lleva el plásmido pKM101 con los genes *mucAB* implicados en la respuesta SOS (Hauser *et al.*, 1992). Recientemente se ha demostrado que la inducción de la respuesta SOS incrementa la transcripción de los genes *nrdAB* que codifican las dos subunidades de la RDRasa (Gibert *et al.*, 1990). Por ello, se decidió construir derivados sin pKM101 de las estirpes estudiadas hasta este momento. Dichas estirpes se denominaron: UC5710 (*wt*), UC844 (*trx<sup>-</sup>*), UC848 (*grx<sup>-</sup>*), UC946 (*grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>\**) y UC827 (*grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>*) (ver Tabla 3, pág. 52).

Tabla 16 . Actividad ribonucleótido reductasa y contenido en glutatión de diversas estirpes de *E. coli*<sup>a</sup>.

Genotipo <sup>b</sup>	Derivadas de UC1101					
	+pKM101			-pKM101		
	RDRasa	Glutación total		RDRasa	Glutación total	Derivadas K38 (-pKM101)
						RDRasa      Glutación total
<i>wt</i>	0,69 ± 0,19 (1,00)	7.612 ± 407 (1,00)		0,25 ± 0,10 (1,00)	8.478 ± 425 (1,00)	0,61 ± 0,25 (1,00)      12.515 ± 429 (1,00)
<i>trx<sup>-</sup></i>	2,20 ± 0,84 (3,20)	5.474 ± 133 (0,72)		0,83 ± 0,31 (3,38)	6.194 ± 155 (0,73)	2,64 ± 1,38 (4,28)      15.467 ± 143 (1,24)
<i>grx<sup>-</sup></i>	0,86 ± 0,22 (1,25)	4.715 ± 112 (0,62)		0,40 ± 0,1 (1,61)	4.757 ± 242 (0,56)	0,76 ± 0,22 (1,26)      15.185 ± 545 (1,21)
<i>grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup> *</i>	7,98 ± 1,69 (11,57)	734 ± 99 (0,10)		2,49 ± 0,16 (10,13)	953 ± 196 (0,11)	8,22 ± 1,41 (13,50)      753 ± 215 (0,06)
<i>grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup></i>	13,12 ± 1,38 (19,04)	5.012 ± 362 (0,65)		5,77 ± 0,47 (23,46)	5.936 ± 113 (0,70)	--      -- --

<sup>a</sup> La actividad RDRasa se expresa como nmoles dCDP/20 min x mg proteína, y el contenido en glutatión total como nmol/g peso seco. Entre paréntesis se indica la relación entre los valores de cada una de las estirpes y los de las estirpes parentales. El asterico diferencia la estirpe *grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup>* incapaz de crecer en medio mínimo.

<sup>b</sup> El genotipo indicado se refiere a las estirpes que se indican a continuación. Derivadas de UC1101 sin plásmido pKM101: UC5710 (*wt*), UC844 (*trx<sup>-</sup>*), UC848 (*grx<sup>-</sup>*), UC946 (*grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup> \**) y UC827 (*grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup>*). Derivados de K38: K38 (*wt*), A307 (*trx<sup>-</sup>*), A407 (*grx<sup>-</sup>*) y A410 (*grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup> \**).

Las estirpes sin plásmido pKM101 mostraron aumentos similares en la actividad ribonucleótido reductasa a los observados en las correspondientes estirpes con plásmidos, aunque en todos los casos los niveles de actividad fueron entre 2 y 3 veces menores. Estos resultados sugieren que, además de estar regulada por los niveles de tiorredoxina y glutarredoxina, la actividad RDRasa está de alguna forma relacionada con la respuesta SOS y más en concreto con el procesamiento de lesiones premutagénicas por las proteínas MucAB, equivalentes a las UmuCD codificadas por genes cromosómicos. El papel de los dos genes clave de la respuesta SOS, *recA* y *lexA*, sobre la regulación de la ribonucleótido reductasa ha sido investigado por diversos autores con resultados contradictorios. Filpula y Fuchs (1977) concluyeron que la inducción de la actividad RDRasa era independiente de los genes *recA*, *recB*, *recC* y *lexA*. Por el contrario Gibert *et al.* (1990) han relacionado los genes *recA* y *lexA* con los niveles de transcripción de los genes *nrd*. No obstante, estos autores consideran este fenómeno como una consecuencia indirecta de alguno(s) gen(es) SOS.

En el apartado III.1.3, pág. 86 se sugirieron diferencias importantes entre el fondo genético de nuestro parental UC1101 y la estirpe K38 utilizada por Russel y Holmgren (1988) para la obtención de estirpes mutantes deficientes en tiorredoxina y glutarredoxina. Los resultados de la Tabla 16 indican que las estirpes derivadas de K38 mostraron inducciones de 4,28 veces en el mutante *trx*<sup>-</sup>, 1,26 en el *grx*<sup>-</sup> y 13,5 en el doble mutante *grx*<sup>-</sup> *trx*<sup>-</sup>\*, similares a las obtenidas en las estirpes derivadas de UC1101. No obstante es de destacar que los niveles de actividad RDRasa en el fondo genético de la K38 fueron unas tres veces superiores a los de las estirpes equivalentes (-pKM101) derivadas de UC1101.

Los resultados mostrados en la Tabla 16 indican que, sea cual fuere el fondo genético inicial, la ausencia de la Grx1 afecta poco a los niveles de ribonucleótido reductasa pues las células pueden utilizar aún la Trx y la Grx3 como donadores de electrones. Comparativamente, la ausencia de tiorredoxina se compensa con un aumento mayor de la ribonucleótido reductasa, de acuerdo con la idea antes expresada de una mayor importancia relativa de la tiorredoxina como donadora de electrones de la RDRasa. La ausencia simultánea de Trx y Grx1 obligan a la ribonucleótido reductasa a usar exclusivamente la Grx3 como donadora de electrones. La baja eficiencia de esta nueva glutarredoxina como donadora de electrones en la reducción de ribonucleótidos se compensa con una subida espectacular en la actividad RDRasa. Estos valores ya muy elevados casi se duplican en aquellos mutantes dobles que crecen en medio mínimo.

### *Contenido en glutatión*

Todas las glutarredoxinas usan GSH como donador de electrones, por lo que la reducción de ribonucleótidos en un doble mutante *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* es absolutamente dependiente de este metabolito. En consecuencia se consideró importante determinar los niveles de glutatión en las estirpes donde previamente se había determinado la actividad RDRasa (Tabla 16). En el fondo genético de UC1101 la deficiencia en tiorredoxina disminuyó el glutatión total al 72% del silvestre, mientras que la deficiencia en glutarredoxina lo bajó hasta el 62%. El doble mutante *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>\** incapaz de crecer en medio mínimo mostró niveles de glutatión 10 veces menores que el silvestre, aunque su derivado capaz de crecer en medio mínimo presentó niveles de glutatión total comparables a los de los mutantes simples. La presencia del plásmido pKM101 no afectó al contenido en glutatión de las estirpes. En el fondo genético de K38 las deficiencias en tiorredoxina o glutarredoxina no sólo no disminuyeron los niveles de glutatión total sino que incluso los incrementaron ligeramente (~20%). Sin embargo, el mutante doble (incapaz de crecer en medio mínimo) presentó niveles de glutatión incluso inferiores a los del mutante equivalente en el fondo UC1101, 6% del silvestre. Es de resaltar que el contenido en glutatión de las estirpes derivadas de K38 fue de 2 a 3 veces superior al de las derivadas de UC1101, de forma similar a los elevados niveles de RDRasa, sugiriendo de nuevo diferencias metabólicas importantes entre ambas estirpes.

Los contenidos en glutatión mostrados en la Tabla 16 indican que, independientemente del fondo genético, las bacterias que carecen simultáneamente de tiorredoxina y glutarredoxina y son incapaces de crecer en medio mínimo tienen niveles muy bajos de glutatión total. En ausencia de estos dos donadores fisiológicos de electrones de la PAPS reductasa, la asimilación de sulfato dependería sólo de la Grx3.

Como se indicó en el apartado III.1.4 (pág. 88) el doble mutante UC646 incapaz de formar colonias en cajas de medio mínimo, presentó un crecimiento mucoso en medio líquido suplementado con cistina. Por ello la determinación de glutatión total se realizó en bacterias crecidas en medio mínimo con casaminoácidos al 0,2% dado que quedaba descartado el medio rico LB por su elevado contenido en glutatión (Alonso-Moraga *et al.*, 1987). El medio mínimo con casaminoácidos contiene 3,2 mg de cistina por litro, es decir 16 veces menos que los medios suplementados con cistina (50 mg/l). En consecuencia, el bajo

contenido en glutatión total de los mutantes dobles incapaces de crecer en medio mínimo podría explicarse por los bajos niveles de cisteína disponibles para sintetizar GSH.

Los altos niveles de glutatión total de los mutantes dobles que crecen en medio mínimo podrían tener diversas explicaciones: i) inducción de las enzimas implicadas en la biosíntesis de GSH, ii) inducción de la PAPS reductasa y iii) aumento en el contenido de Grx3. Los mayores niveles de GSH y RDRasa, junto con el posible aumento de Grx3, explicaría el crecimiento en cajas de medio mínimo de UC647 y su derivado sin plásmido pKM101.



### **III.2. ESTIRPES SOBREPRODUCTORAS DE TIORREDOXINA, GLUTARREDOXINA Y RIBONUCLEÓTIDO REDUCTASA**

En el apartado anterior se mostró que la deficiencia en tiorredoxina aumentaba los niveles de glutarredoxina y viceversa, y que las deficiencias en estos dos donadores de electrones provocaba aumentos espectaculares en la actividad ribonucleótido reductasa. Por ello se planteó la estrategia contraria, es decir, analizar las consecuencias de la sobreproducción de estas tres proteínas. Plásmidos multicopia portadores de los genes *trx*, *grx*, y *nrdAB*, y el correspondiente vector de clonación pBR322, se introdujeron en las estirpes UC5710 (*wt*) y UC827 (*grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>*) por transformación (ver Materiales y Métodos, apartado II.3.4., pág. 58). La sobreproducción de estas proteínas no alteró el crecimiento de las estirpes en comparación con sus parentales, con o sin plásmido pBR322. Tampoco se observaron diferencias entre las estirpes construidas en relación a su respuesta a agentes mutagénicos (datos no mostrados).

#### **III.2.1 Caracterización bioquímica de las estirpes sobreproductoras.**

##### ***Niveles de tiorredoxina y glutarredoxina***

La Tabla 17 muestra los niveles de tiorredoxina y glutarredoxina en estirpes sobreproductoras derivadas del tipo silvestre UC5710. La sobreproducción de Trx disminuyó la cantidad de Grx1 y viceversa, de forma que en la estirpe sobreproductora de Trx (10,41 veces más que el *wt*) la glutarredoxina descendió al 24% del control con pBR322, y en la sobreproductora de Grx1 (x 15,42 veces) la tiorredoxina resultó ser el 50% de la del silvestre. Estos resultados apoyan la idea anteriormente expresada (apartado III.1.6., pág. 100) de que el sistema tiorredoxina-glutarredoxina estaría finamente regulado, de forma que la deficiencia o sobreproducción de una de estas dos proteínas provocaría el efecto contrario en la síntesis de la otra proteína con la consiguiente economía en el gasto energético celular.

Los cambios en el contenido de proteína determinados por ELISA no se reflejaron a nivel de actividad enzimática, ya que la estirpe sobreproductora de Trx mostró una actividad glutarredoxina de 1,19 comparada con su parental con

Tabla 17. Efecto de la sobreproducción de Trx, Grx y RDRasa sobre los niveles de tiorredoxina y glutarredoxina del tipo silvestre UC5710<sup>a</sup>.

Genotipo	Proteína sobreproducida	Tiorredoxina		Glutarredoxina	
		Actividad	ELISA	Actividad	ELISA
UC5710 / pBR322	--	98,1 ± 8,8 (1,00)	4.216 ± 500 (1,00)	44,5 ± 9,3 (1,00)	384 ± 65 (1,00)
UC5710 / pBHK8	Trx	390 ± 21 (3,98)	43.887 ± 6.171 (10,41)	53,0 ± 18,8 (1,19)	92,2 ± 16,0 (0,24)
UC5710 / pBR322ECG	Grx	90,1 ± 9,7 (0,92)	2.105 ± 517 (0,50)	740 ± 158 (16,63)	5.931 ± 636 (15,42)
UC5710 / pAL7	RDRasa	101 ± 6 (1,03)	2.264 ± 76 (0,53)	55,8 ± 13,0 (1,25)	358 ± 62 (0,93)

<sup>a</sup> Las actividades enzimáticas se expresan como nmoles dCDP/20 min x mg proteína, y los resultados de ELISA como ng de tiorredoxina o glutarredoxina/mg proteína total. Entre paréntesis se indica la relación entre los niveles de tiorredoxina o glutarredoxina de cada estirpe y los de la estirpe parental UC5710 / pBR322.

pBR322, y la actividad tiorredoxina en la estirpe sobreproductora de Grx1 resultó ser de 0,92. Estos resultados podrían explicarse por una cierta actividad cruzada de la Trx en el ensayo de la Grx y viceversa, teniendo en cuenta los elevados niveles de estas proteínas en las estirpes sobreproductoras.

La sobreproducción de Grx1 se detectó con igual eficiencia por ELISA (x 15,42) y por actividad enzimática (x 16,63), a diferencia de la sobreproducción de Trx en cuyo caso la actividad enzimática sólo detectó un aumento de 3,98 veces frente a las 10,41 veces determinadas por ELISA. Esto podría deberse a que alguno de los componentes del ensayo de actividad tiorredoxina fuese limitante para los elevados niveles de Trx existentes en las estirpes sobreproductoras.

La sobreproducción de RDRasa afectó más a la tiorredoxina que a la glutarredoxina, disminuyendo a la mitad los niveles de Trx determinados por ELISA, mientras que los niveles de Grx1 fueron similares al control. Como se vio en la Tabla 16 (pág. 106), la tiorredoxina parece ser mucho más importante que la glutarredoxina en la reducción de ribonucleótidos. Por esto es lógico que sea el contenido en tiorredoxina el que más se afecte por los cambios en concentración de la ribonucleótido reductasa.

La Tabla 18 muestra el efecto de la sobreproducción de Trx, Grx y RDRasa en el doble mutante UC827. Como era de esperar, esta estirpe con el plásmido pBR322 mostró niveles indetectables de Trx y Grx1 en las determinaciones por ELISA. Sin embargo, mantuvo un 14% de actividad glutarredoxina residual en comparación con su parental (ver Tabla 17; atribuible a la Grx3), tal como se mostró en el apartado III.1.6. para la estirpe UC647, mientras que la actividad tiorredoxina resultó inferior al 1%.

El plásmido pBHK8 superproductor de Trx aumentó el contenido de esta proteína en el doble mutante más de 40.000 veces. La actividad glutarredoxina aumentó 5,11 veces en relación al parental (31,9 *versus* 6,24 nmoles dCDP/20 min x mg proteína). Puesto que estas bacterias carecen por completo de Grx1 y a la Grx3 sólo se pueden atribuir 6,24 nmoles dCDP/20 min x mg proteína, este aumento de actividad glutarredoxina podría explicarse por la postulada actividad cruzada de la enorme cantidad de Trx presente en esta estirpe. De forma similar, la sobreproducción de Grx1 en el doble mutante (>10.000 veces más que el parental) aumentó la actividad tiorredoxina 25,52 veces. Los enormes cambios

Tabla 18. Efecto de la sobreproducción de Trx, Grx y RDRasa sobre los niveles de tiorredoxina y glutarredoxina del mutante doble UC827 (*grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup>*)<sup>a</sup>.

Genotipo	Proteína sobreproducida	Tiorredoxina		Glutarredoxina	
		Actividad	ELISA	Actividad	ELISA
UC827/pBR322	--	0,62 ± 0,27 (1,00)	<0,54 (1,00)	6,24 ± 2,63 (1,00)	<0,96 (1,00)
UC827/pBHK8	Trx	328 ± 18 (529,52)	21.753 ± 3.077 (40.283)	31,9 ± 5,8 (5,11)	<0,96 (1,00)
UC827/pBR322ECG	Grx	15,8 ± 5,9 (25,52)	<0,54 (1,00)	541 ± 111 (86,76)	10.329 ± 132 (10.759)
UC827/pAL7	RDRasa	0,71 ± 0,09 (1,15)	<0,54 (1,00)	7,03 ± 1,47 (1,13)	<0,96 (1,00)

<sup>a</sup> Las actividades enzimáticas se expresan como nmoles dCDP/20 min x mg proteína, y los resultados de ELISA como ng de tiorredoxina o glutarredoxina/mg proteína total. Entre paréntesis se indica la relación entre los niveles de tiorredoxina o glutarredoxina de cada estirpe y los de la estirpe parental UC827/pBR322.

determinados por ELISA en los contenidos de Trx y Grx1 como consecuencia de su sobreproducción, se reflejaron sólo parcialmente en los niveles de actividad, debido posiblemente a la limitación de alguno de los componentes de los correspondientes ensayos de actividad enzimática. Como era lógico en una estirpe sin tiorredoxina ni glutarredoxina, la sobreproducción de ribonucleótido reductasa no tuvo ningún efecto.

Para comprobar si la tiorredoxina mostraba actividad cruzada en el ensayo de glutarredoxina se diseñó un experimento con anticuerpos anti-Trx cuyos resultados se muestran en la Tabla 19. La efectividad de estos anticuerpos se demostró añadiendo a la mezcla de reacción tiorredoxina pura y tiorredoxina reductasa. Concentraciones crecientes de anticuerpo anti-Trx se incubaron con extractos de estirpes en las que se había detectado el efecto inespecífico de la Trx sobre la actividad Grx y sus correspondientes controles. Tanto en el tipo silvestre como en el mutante simple *grx<sup>-</sup>* cantidades crecientes de anti-Trx disminuyeron la actividad glutarredoxina, demostrando que la tiorredoxina tiene actividad cruzada en el ensayo de la glutarredoxina. Como era de esperar, este efecto no se observó en las bacterias *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>*, cuya actividad específica (~5 nmoles dCDP/20 min x mg proteína) era atribuible a la Grx3. La adición de 25 µl de anticuerpo tituló completamente la Trx presente en el tipo silvestre y el mutante *grx<sup>-</sup>*. La actividad específica remanente en el tipo silvestre (23,31) se debe a la suma de Grx1 y Grx3, y en el mutante *grx<sup>-</sup>* (4,67) a la presencia exclusiva de Grx3. En el doble mutante sobreproductor de tiorredoxina hicieron falta 50 µl de anticuerpo anti-Trx para disminuir la actividad glutarredoxina hasta los niveles de dicha estirpe con el plásmido control (~5 nmoles dCDP/20 min x mg proteína). Los resultados obtenidos confirman la hipótesis de que la Trx puede actuar de forma inespecífica en la reducción de ribonucleótidos dependiente de GSH y glutatión reductasa posiblemente en un único paso de reducción ya que los extractos están calentados 5 min a 85°C y no existe, por tanto, en ellos tiorredoxina reductasa.

La no disponibilidad de anticuerpos anti-Grx1 impidió realizar el experimento complementario para demostrar si la actividad tiorredoxina existente en el doble mutante sobreproductor de Grx1 era debida a ésta. No obstante, dado que en la célula hay diez veces menos Grx1 que Trx se comprende que no se detecte actividad cruzada de la Grx1 en el ensayo tiorredoxina en el mutante simple *trx<sup>-</sup>* o doble *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>*. Por ello, sólo se detecta actividad residual tiorredoxina cuando se sobreexpresa la Grx1.

**Tabla 19. Efecto de la adición de anticuerpos anti-tiorredoxina sobre la actividad glutarredoxina de distintas estirpes derivadas de UC1101<sup>a</sup>.**

Estirpe	Anticuerpos Anti-Trx añadidos (μl) <sup>a</sup>			
	0	12,5	25	50
<i>wt</i> (UC1101)	1,494 <sup>c</sup> (34,37) <sup>d</sup>	1,185 (25,00)	1,059 (23,31)	nd
<i>grx</i> <sup>-</sup> (UC525)	0,425 (10,02)	0,287 (5,14)	0,274 (4,67)	nd
<i>wt</i> / pBR322 (UC871)	1,197 (33,80)	0,729 (20,48)	0,742 (20,93)	nd
<i>trx</i> <sup>-</sup> <i>grx</i> <sup>-</sup> (UC647)	0,249 (4,46)	0,249 (4,46)	0,250 (4,50)	nd
<i>trx</i> <sup>-</sup> <i>grx</i> <sup>-</sup> / pBR322 (UC928)	0,329 (5,22)	0,365 (6,25)	0,325 (5,13)	nd
<i>trx</i> <sup>-</sup> <i>grx</i> <sup>-</sup> / pBRHK8 (UC919)	1,815 (31,15)	1,781 (30,58)	1,798 (30,86)	0,430 (5,36)
Mezcla <sup>b</sup> + TR (1OD) + Trx (0,1 mM)	23,640	17,602	11,379	0,020

<sup>a</sup> El título de los anticuerpos anti-Trx era de 1,875 nmol/ml.

<sup>b</sup> La mezcla contiene: NADPH, BSA, <sup>3</sup>H-CDP (22.000 cpm), ATP, MgCl<sub>2</sub>, GSH y GR de levadura.

<sup>c</sup> Expresado como nmol dCDP/20 min.

<sup>d</sup> Expresado como nmol dCDP/20 min x mg proteína.

### **Actividad RDRasa y contenido en glutatión**

La sobreproducción de Trx o Grx1 disminuyó la actividad RDRasa del tipo silvestre y del doble mutante *grx*<sup>-</sup>*trx*<sup>-</sup> (Tabla 20). La presencia del plásmido pBHK8 sobreproductor de Trx disminuyó la actividad RDRasa hasta el 41% en el tipo silvestre y hasta el 8% en el doble mutante. De forma análoga, la

Tabla 20. Efecto de la sobreproducción de Trx, Grx y RDRasa sobre la actividad del tipo silvestre UC5710 y del doble mutante UC827 (*grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>*)<sup>a</sup>.

Plásmido	Proteína sobreproducida	UC5710		UC827	
		RDRasa	Glutación total	RDRasa	Glutación total
pBR322	--	0,27 ± 0,07 (1,00)	4.767 ± 296 (1,00)	3,83 ± 0,94 (1,00)	6.306 ± 230 (1,00)
pBHK8	Trx	0,11 ± 0,05 (0,41)	3.191 ± 433 (0,67)	0,30 ± 0,05 (0,08)	6.297 ± 166 (1,00)
pBR322ECG	Grx	0,09 ± 0,03 (0,32)	13.469 ± 224 (2,83)	0,47 ± 0,03 (0,12)	12.585 ± 285 (2,00)
pAL7	RDRasa	119 ± 16 (445,23)	5.765 ± 140 (1,21)	122 ± 30 (31,85)	2.230 ± 139 (0,35)

<sup>a</sup> Las actividades enzimáticas se expresan como nmoles dCDP/20 min x mg proteína, y los resultados de ELISA como ng de tiorredoxina o glutaredoxina/mg proteína total. Entre paréntesis se indica la relación entre los niveles de tiorredoxina o glutaredoxina de cada estirpe y los de su correspondiente parental con el plásmido pBR322.

presencia del plásmido pBR322ECG sobreproductor de glutarredoxina provocó un descenso de RDRasa hasta el 32% en el tipo silvestre y hasta el 12% en el mutante doble. El mayor efecto de la sobreproducción de Trx ó Grx1 sobre los niveles de actividad RDRasa en el doble mutante que en el tipo silvestre se explica por los altos niveles de RDRasa en las bacterias *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* (3.83 *versus* 0,27). De hecho, la sobreproducción de estas dos proteínas en el doble mutante devuelve la actividad RDRasa hasta los niveles del tipo silvestre. La actividad RDRasa en la estirpe sobreproductora de esta proteína fue 445 veces superior a la del control confirmando la alta eficiencia del plásmido pAL7 (Larsson y Sjöberg, 1986).

Estos resultados complementan los descritos anteriormente mostrando incrementos espectaculares de actividad RDRasa en bacterias que carecen simultáneamente de Trx y Grx1. En su conjunto, todos estos resultados apoyan la idea de que el sistema formado por estas tres proteínas está finamente regulado, de forma que incrementos en uno de los componentes provoca disminuciones en los otros y viceversa, equilibrándose la síntesis de desoxirribonucleótidos.

La sobreproducción de glutarredoxina incrementó el contenido de glutatión 2,83 veces en el tipo silvestre y 2 veces en el doble mutante. Dado que la glutarredoxina es reducida por GSH este aumento paralelo optimizaría esta vía de reducción de ribonucleótidos. La sobreproducción de Trx y RDRasa provocó variaciones menos importantes de los niveles de glutatión, a excepción de UC827/pAL7 en la que el glutatión descendió al 35% del parental. No obstante, este bajo contenido en glutatión podría ser suficiente para mantener una adecuada reducción de ribonucleótidos en esta estirpe sobreproductora de RDRasa.



### III.3. MUTANTES NULOS EN GLUTATIÓN Y/O ÁCIDO LIPOICO

#### III.3.1. Construcción de la estirpe UC858 portadora de la mutación *gshA::Tn10kan* (Figura 19)

El doble mutante *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* posee actividad residual de reducción de ribonucleótidos dependiente de GSH. Habiéndose demostrado la ausencia de Trx y Grx1 en este doble mutante se decidió proseguir este trabajo combinando la deficiencia en estas dos proteínas con la deficiencia en GSH para estudiar el papel de este metabolito en la síntesis de desoxirribonucleótidos. La ruta de biosíntesis de glutatión se bloqueó en su primer paso, la síntesis de  $\gamma$ -glutamilcisteína catalizada por la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa codificada por el gen *gshA*. En esta reacción, una molécula de glutamato se une a otra de cisteína para dar el primer intermediario en la síntesis de GSH. Al bloquear este primer paso se impide una posible acción inespecífica del  $\gamma$ -Glu-Cys que podría sustituir en algunas de sus funciones al glutatión.

La mutación *gshA::Tn10kan* se transfirió por transducción con el fago P1 desde la estirpe A397 (Russel *et al.*, 1990) a la estirpe receptora UC5710 (como UC1101 pero sin el plásmido pKM101). Los transductantes se seleccionaron por resistencia a kanamicina (Km<sup>r</sup>) y posteriormente se comprobó su capacidad de crecer en medio mínimo y su sensibilidad a diamida (Apontoweil y Berends, 1975). Uno de estos transductantes se denominó UC858.

#### III.3.2. Construcción de la estirpe UC859 portadora de las mutaciones *gshA::Tn10kan ΔtrxA* (Figura 19)

La estirpe se construyó de forma análoga a la anterior con la única diferencia de que la estirpe receptora era deficiente en tiorredoxina (UC844). La mutación *gshA::Tn10kan* se transfirió desde su estirpe donadora A397 a la receptora UC844 ( $\Delta$ *trxA*). Los transductantes se seleccionaron por resistencia a kanamicina y posteriormente se comprobó su resistencia al fago T7 y sensibilidad a diamida. Uno de estos transductantes se denominó UC859. La estirpe UC859 deficiente en GSH y Trx fue capaz de crecer en cajas de medio mínimo, a diferencia de una construcción análoga realizada por Russel *et al.* (1990) en el fondo genético K38 que sólo creció en medio mínimo suplementado con cistina.

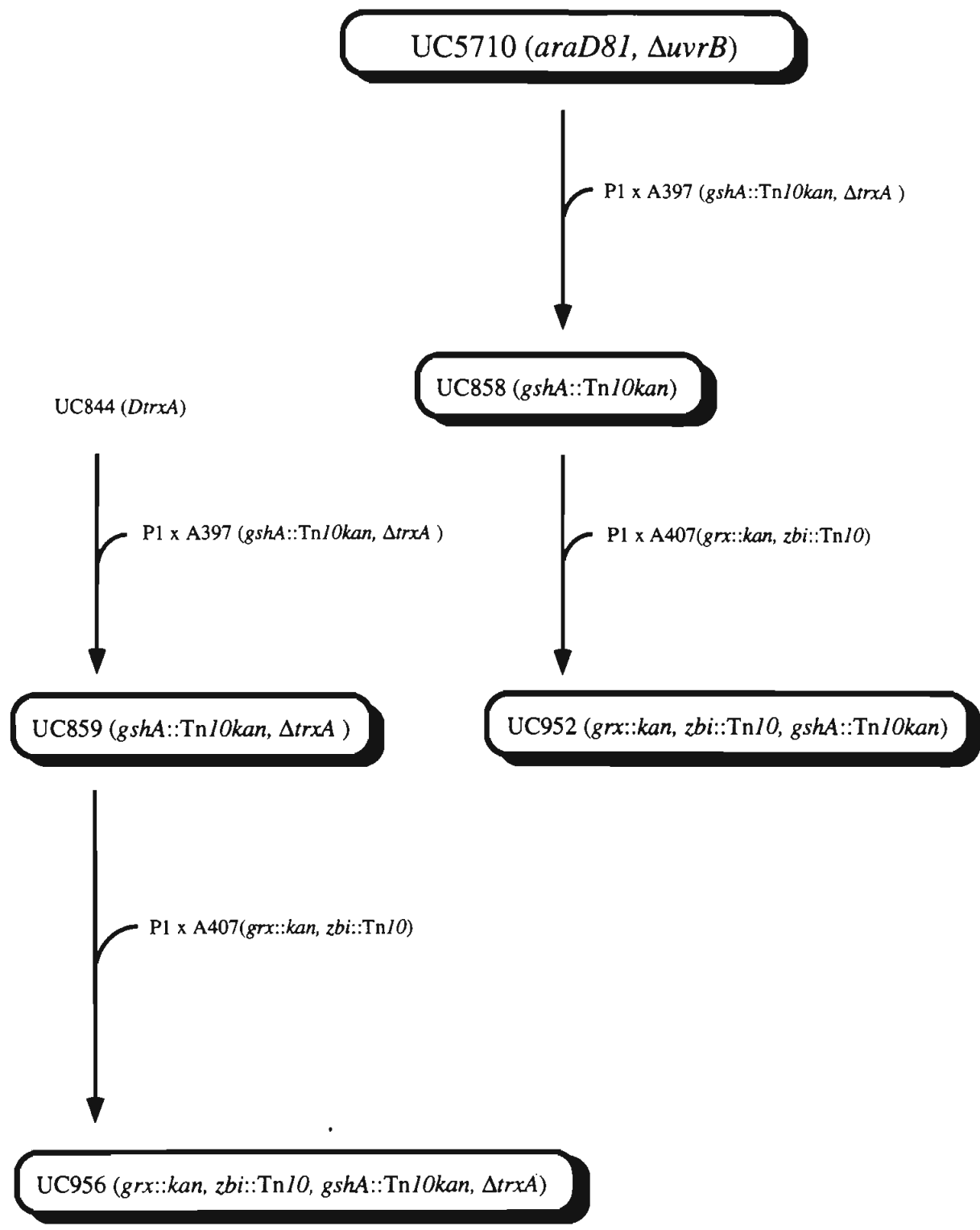


Figura 19. Construcción de las estirpes de *E. coli* deficientes en glutatión. En las estirpes UC952 y UC956 la presencia de la mutación *grx::kan* se comprobó mediante una segunda transducción usando la parental silvestre UC1101 como estirpe receptora.

Las diferencias entre los fondos genéticos de UC1101 y K38 se han comentado anteriormente en relación al crecimiento en cajas de medio mínimo del doble mutante *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* (UC647). En teoría, una bacteria *gsh<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* sería incapaz de reducir ribonucleótidos dado que carece de tiorredoxina y del donador de electrones de las glutarredoxinas Grx1 y Grx3. La capacidad de crecer en cajas de medio mínimo de la estirpe UC859 sugiere la existencia de donadores alternativos de electrones para la reducción de ribonucleótidos y la reducción de sulfato. No obstante, es de destacar que el crecimiento de la estirpe UC859 (*gsh<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>*) en cajas de medio mínimo mejoró en presencia de cistina.

### III.3.3. Construcción de la estirpe UC952 portadora de las mutaciones *grx::kan gshA::Tn10kan* (Figura 19)

La mutación *gshA::Tn10kan* no se pudo transferir a una estirpe deficiente en glutarredoxina pues la mutación *grx::kan* confiere el mismo fenotipo de resistencia a kanamicina. Por ello se siguió una estrategia distinta, en la que la mutación *grx::kan* se transfirió a la estirpe UC858 (*gshA::Tn10kan*) seleccionando para el marcador *zbi::Tn10* (resistencia a tetraciclina) estrechamente ligado a la mutación *grx::kan*. La transferencia de la mutación *grx::kan* se comprobó mediante una segunda transducción usando la estirpe silvestre como receptora y varios de los transductantes Tc<sup>r</sup> como donadores. Uno de estos transductantes capaces de transferir simultáneamente la resistencia a kanamicina y tetraciclina se denominó UC952. Esta estirpe creció en medio mínimo de forma similar al silvestre, debido a que dispone niveles normales de tiorredoxina para la reducción de sulfato y de ribonucleótidos.

### III.3.4. Construcción de la estirpe UC956 portadora de las mutaciones *grx::kan gshA::Tn10kan ΔtrxA* (Figura 19)

Los genes *grxA* y *gshA* están interrumpidos por genes de resistencia a kanamicina, por lo que el triple mutante (*grx<sup>-</sup>gsh<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>*) se construyó mediante una estrategia similar a la de la estirpe UC952 (*grx<sup>-</sup>gsh<sup>-</sup>*). Como donadora se empleó la estirpe A407 (*grx::kan* y *zbi::Tn10*) y como receptora el doble mutante UC859 (*gshA::Tn10kan*, *ΔtrxA*). La transferencia de la mutación *grx::kan* se confirmó por cotransducción con el marcador *zbi::Tn10*. Una vez hecha esta confirmación se eligió uno de los triples mutantes *grx<sup>-</sup>gsh<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* que se denominó UC956. Esta

estirpe creció en medio mínimo muy lentamente dando colonias diminutas tras varios días de incubación a 37°C.

Esta es la primera vez que se ha construido una estirpe deficiente simultáneamente en Trx, Grx1 y GSH (el donador de electrones de todas las glutarredoxinas conocidas). El crecimiento en cajas de medio mínimo de estas bacterias, aunque disminuido, demuestra la capacidad de la Grx3 de actuar como donador alternativo de electrones para la reducción de sulfato y ribonucleótidos, indicando además que tienen que existir otras fuentes de equivalentes de reducción distintas del NADPH y el GSH, tal vez un compuesto con grupos tioles.

### III.3.5. Construcción de la estirpe UC938 portadora de la mutación *lipA2* (Figura 20)

El ácido lipoico es un ditiol que podría reducir el disulfuro redox-activo de tiorredoxina y/o glutarredoxina. De hecho, Holmgren (1979b) demostró que el ácido lipoico reduce *in vitro* a la tiorredoxina. Se ha postulado que la lipoamida deshidrogenasa de los complejos multienzimáticos piruvato- y  $\alpha$ -cetoglutarato-deshidrogenasa es incapaz de reoxidar todas las moléculas de lipoamida generadas durante el funcionamiento normal de estas enzimas. Este exceso de lipoamida reducida constituiría una ruta alternativa de cesión de electrones a procesos mediados por intercambios tiol/disulfuro (Frey *et al.*, 1978; Holmgren, 1979). En base a estos resultados y la viabilidad de los mutantes *gshA<sup>-</sup>trxA<sup>-</sup>* y *grx<sup>-</sup>gshA<sup>-</sup>trxA<sup>-</sup>*, se decidió estudiar el papel del ácido lipoico como posible ruta alternativa de reducción de la glutarredoxina o incluso directamente de la ribonucleótido reductasa (Fuchs *et al.*, 1983). Para ello se combinó la deficiencia en ácido lipoico con las deficiencias en Trx, Grx1 y/o glutatión de las estirpes construidas previamente.

Al inicio de este trabajo, la única mutación existente en la biosíntesis de ácido lipoico era la denominada *lip2* (Herbert y Guest, 1968). Estudios recientes han asignado esta mutación a uno de los dos grupos de complementación responsables de la síntesis del ácido lipoico pasando a denominarse *lipA2* (Vandem Boom *et al.*, 1992). Esta mutación no es seleccionable por lo que se construyó una estirpe intermedia por transferencia con el fago P1 del marcador *zbe279::Tn10* que mapea, al igual que la mutación *lipA2*, en el minuto 15 del cromosoma de *E. coli*. Como donadora en esta construcción se utilizó la estirpe

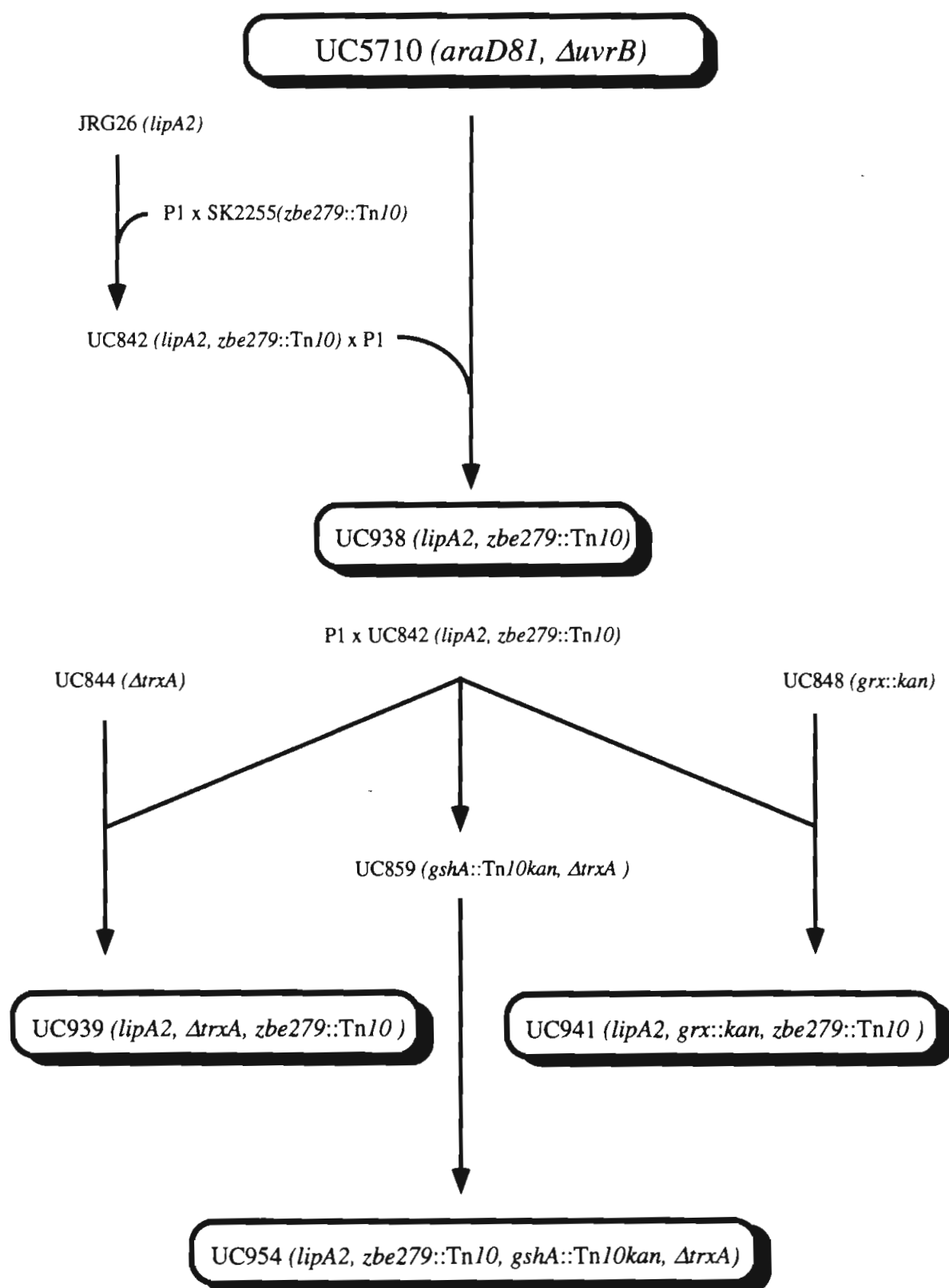


Figura 20. Construcción de las estirpes deficientes en ácido lipóico.

SK2255 (Tabla 2, pág. 51) y como receptora la estirpe JRG26 (*lipA2*) (Herbert y Guest, 1968). Los transductantes se seleccionaron por resistencia a tetraciclina (*Tn10*) e incapacidad de crecer en medio mínimo en ausencia de ácido lipoico o una mezcla de acetato y succinato, aunque la tasa de crecimiento en este último caso es aproximadamente la mitad que con ácido lipoico. Se eligió al azar uno de estos transductantes y se denominó UC842.

Posteriormente UC842 (*lipA2*, *zbe279::Tn10*) se usó como donadora en una segunda transducción cuya receptora fue el parental silvestre UC5710. En esta transducción la mutación *lipA2* se transfirió por cotransducción con *zbe::Tn10*. Los transductantes se seleccionaron por resistencia a tetraciclina e incapacidad de crecer en medio mínimo a menos que este se suplementase con ácido lipoico o una mezcla de acetato y succinato. Se eligió al azar uno de estos transductantes y se le denominó UC938. Esta estirpe creció en medio rico LB sin suplementar con ácido lipoico debido a la presencia de este metabolito en cantidades traza en dicho medio.

El requerimiento de lipoato o de una mezcla de acetato y succinato en las estirpes *lipA2* para su crecimiento en medio mínimo (Herbert y Guest, 1968; Vandem Boom *et al.*, 1992) se explica por el papel del ácido lipoico como grupo prostético en la descarboxilación oxidativa de piruvato o  $\alpha$ -cetoglutarato. Estos procesos están catalizados por complejos multienzimáticos que poseen en común la subunidad dihidrolipoamida aciltransferasa con ácido lipoico unido por enlaces amida a residuos específicos de lisina. La adición de acetato y succinato, productos de la descarboxilación del piruvato y  $\alpha$ -cetoglutarato, solventa la incapacidad de los mutantes *lipA2* para llevar a cabo estas reacciones. Sin embargo, la pérdida de equivalentes de reducción y la necesidad de activar el acetato y succinato explicaría la menor tasa de crecimiento.

### III.3.6. Construcción de las estirpes UC939 y UC941 portadoras de las mutaciones *lipA2* $\Delta trxA$ y *lipA2* *grx::kan*, respectivamente (Figura 20)

Los dobles mutantes *lip<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* y *lip<sup>-</sup>grx<sup>-</sup>* se construyeron por transducción con el fago P1 usando la estirpe UC842 (*lipA2*, *zbe279::Tn10*) como donadora y las estirpes UC844 ( $\Delta trxA$ ) y UC848 (*grx::kan*) como receptoras. Los transductantes se seleccionaron por resistencia a tetraciclina y entre ellos se buscaron aquellos incapaces de crecer en medio mínimo salvo que éste se

suplementase con ácido lipoico o una mezcla de acetato y succinato. En cada tipo de transducción se salvó un transductante denominándose UC939 y UC941, respectivamente. No se observó ninguna diferencia entre el crecimiento de estos dobles mutantes y el mutante simple *lip<sup>-</sup>*. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que la estirpe *lip<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* tiene intacta su capacidad de biosíntesis de desoxirribonucleótidos vía GSH y glutarredoxinas, y la estirpe *lip<sup>-</sup>grx<sup>-</sup>* vía tiorredoxina.

### III.3.7. Construcción de la estirpe UC954 portadora de las mutaciones *lipA2 gshA::Tn10kan ΔtrxA* (Figura 20)

La construcción de la estirpe UC954 (*lipA2, zbe279::Tn10, gshA::Tn10kan, ΔtrxA*) tuvo por objetivo bloquear todas las rutas posibles de reducción de ribonucleótidos, a saber, tiorredoxina, glutatión/glutarredoxinas y lipoico/glutarredoxinas. Dicha construcción se llevó a cabo mediante transducción con fago P1, usando como receptora la estirpe UC859 (*gshA::Tn10kan, ΔtrxA*) y como donadora UC842 (*lipA2, zbe279::Tn10*). Los transductantes se seleccionaron por resistencia a tetraciclina y adicional sensibilidad a diamida, resistencia al fago T7 e incapacidad de crecer en medio mínimo a menos que éste se suplementase con ácido lipoico. UC954 creció, en medio rico LB, de forma similar a todas las estirpes *lip<sup>-</sup>* anteriormente construidas. Sin embargo, aunque crecía en medio mínimo suplementado con ácido lipoico, fue incapaz de crecer en medio mínimo suplementado con acetato y succinato.

### III.3.8. Caracterización bioquímica de las estirpes deficientes en glutatión y/o ácido lipoico.

#### *Niveles de tiorredoxina y glutarredoxina*

La Tabla 21 muestra las determinaciones de tiorredoxina y glutarredoxina, tanto a nivel de actividad como de cantidad de proteína, de todas las estirpes cuya construcción se describe en el apartado III.3, incluyéndose UC5710, UC844, UC848 y UC827 como estirpes control.

La deficiencia en glutatión incrementó 5,53 veces la cantidad de glutarredoxina con respecto al silvestre. La combinación de la deficiencia en GSH con la deficiencia en Trx disparó la cantidad de glutarredoxina multiplicándola

por 54,90 veces. Este aumento se hizo aún más notable en el mutante triple *lip<sup>-</sup>gsh<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* que poseía 63,72 veces más glutarredoxina que el silvestre. No obstante, en los tres casos el aumento de actividad enzimática fue unas 5 veces inferior al de la proteína sugiriendo que una parte importante de Grx1 se encontraba inactiva. El GSH podría estabilizar a la glutarredoxina mediante su unión al sitio activo y/o la participación de su grupo SH en el plegamiento o mantenimiento de la estructura de la proteína. En apoyo de esta hipótesis la Tabla 17 (pág. 111) muestra que en estirpes *gsh<sup>+</sup>* los incrementos de 15,42 veces en la cantidad de glutarredoxina se correspondieron con incrementos similares (16,63 veces) en los niveles de actividad.

Los incrementos de Grx1 observados en ausencia de GSH sugieren un fino control de la ruta de reducción de ribonucleótidos en la que participan ambas moléculas. En ausencia de GSH las glutarredoxinas se ven obligadas a funcionar con otros donadores alternativos como el postulado ácido lipoico. La menor eficiencia de estos otros donadores se vería compensada aumentando los niveles de glutarredoxina. Estos aumentos tienen que ser aún mucho mayores si además falta Trx, dado que en estas condiciones la reducción de ribonucleótidos dependería exclusivamente de las glutarredoxinas.

La deficiencia en GSH incrementó en menor medida (1,90 veces) la cantidad de Trx que la de glutarredoxina, como era de esperar dado que el GSH no es sustrato de la Trx. Es de destacar la existencia de actividad tiorredoxina en estirpes que por ELISA mostraban una carencia total de esta proteína. Así, UC859 (*gsh<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>*) y UC954 (*lip<sup>-</sup>gsh<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>*) presentaban respectivamente un 10% y un 14% de la actividad tiorredoxina del tipo silvestre. Como se acaba de mencionar, en estas estirpes se incrementó de forma dramática (54,90 y 63,72 veces) la cantidad de glutarredoxina. Esta alta cantidad de glutarredoxina, mayor incluso que la detectada en las estirpes sobreproductoras Tabla 17 (pág. 111), podría actuar de forma inespecífica en el ensayo de la tiorredoxina, como se discutió anteriormente (pág. 113).

La deficiencia en ácido lipoico incrementó la cantidad de Trx y sobre todo la de glutarredoxina en menor medida que la deficiencia en GSH. Estos datos sugieren que el ácido lipoico tiene un papel mucho menor que el GSH en la reducción de ribonucleótidos. No obstante, hay que destacar que las células utilizadas en estas mediciones se crecieron en medio rico LB suplementado con ácido lipoico para evitar la reversión de la mutación *lip2* (Herbert y Guest, 1968).



**Tabla 21. Niveles de tiorredoxina y glutarredoxina en estirpes deficientes en glutatión y/o ácido lipoico derivadas de UC5710<sup>a</sup>.**

Genotipo	Tiorredoxina		Glutarredoxina	
	Actividad	ELISA	Actividad	ELISA
<i>wt</i> (UC5710)	78,7 ± 6,7 (1,00)	1.911 ± 142 (1,00)	64,9 ± 9,1 (1,00)	129 ± 15 (1,00)
<i>gsh</i> <sup>-</sup> (UC858)	86,3 ± 8,8 (1,10)	3.624 ± 280 (1,90)	67,4 ± 7,9 (1,04)	714 ± 184 (5,53)
<i>lip</i> <sup>-</sup> (UC938)	71,1 ± 1,6 (0,90)	2.674 ± 344 (1,40)	33,7 ± 0,9 (0,52)	198 ± 51 (1,53)
<i>trx</i> <sup>-</sup> (UC844)	0,00 (0,00)	<0,54 (<0,0002)	80,0 ± 3,2 (1,23)	287 ± 13 (2,22)
<i>grx</i> <sup>-</sup> (UC848)	87,0 ± 3,2 (1,11)	2.325 ± 140 (1,22)	12,8 ± 3,4 (0,20)	<0,96 (<0,007)
<i>gsh</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> (UC859)	7,87 ± 0,83 (0,10)	<0,54 (<0,0002)	629 ± 91 (9,69)	7.093 ± 585 (54,90)
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>gsh</i> <sup>-</sup> (UC952)	129 ± 7 (1,64)	2.885 ± 150 (1,51)	13,8 ± 1,8 (0,21)	<0,96 (<0,007)
<i>lip</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> (UC939)	1,62 ± 0,78 (0,02)	<0,54 (<0,0002)	38,9 ± 1,6 (0,60)	355 ± 74 (2,75)
<i>lip</i> <sup>-</sup> <i>grx</i> <sup>-</sup> (UC941)	69,2 ± 2,9 (0,88)	2.839 ± 397 (1,49)	9,93 ± 0,62 (0,15)	<0,96 (<0,007)
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> (UC827)	0,34 ± 0,08 (0,004)	<0,54 (<0,0002)	5,77 ± 1,39 (0,09)	<0,96 (<0,007)
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>gsh</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> (UC956)	1,41 ± 0,22 (0,02)	<0,54 (<0,0002)	3,67 ± 1,43 (0,05)	<0,96 (<0,007)
<i>lip</i> <sup>-</sup> <i>gsh</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> (UC954)	10,8 ± 1,2 (0,14)	<0,54 (<0,0002)	812 ± 105 (12,50)	8.232 ± 592 (63,72)

<sup>a</sup> Las actividades enzimáticas se expresan como nmoles dCDP/20 min x mg proteína, y los resultados de ELISA como ng de tiorredoxina o glutarredoxina/mg proteína total. Entre paréntesis se indica la relación entre los niveles de tiorredoxina o glutarredoxina de cada estirpe y los de la estirpe parental UC5710.

Esto podría implicar que los efectos de la deficiencia en ácido lipoico estuvieran infravalorados. Sin embargo, los efectos de la deficiencia en GSH sobre los niveles de glutarredoxina fueron muy importantes a pesar de que el medio rico LB también posee alto contenido en GSH. En un futuro próximo se reexaminarán estos resultados intentando crecer las bacterias en medios carentes de ácido lipoico y GSH. En las estirpes deficientes en ácido lipoico (igual que en las deficientes en GSH) los incrementos de actividad glutarredoxina fueron inferiores a los de proteína detectada por ELISA. El posible efecto protector del ácido lipoico sobre la actividad glutarredoxina es menos plausible que el del GSH dada la baja concentración intracelular del ditiol y la ausencia en dicha proteína de un sitio de unión específico para el ácido lipoico.

La incapacidad de UC954 de crecer en medio mínimo suplementado con acetato y succinato sugiere un papel esencial del ácido lipoico en el crecimiento bacteriano, distinto de su papel en las descarboxilaciones oxidativas del ciclo de Krebs. El ácido lipoico podría ceder electrones a las glutarredoxinas o incluso directamente a la ribonucleótido reductasa en la ruta de biosíntesis de desoxirribonucleótidos. Esta es la primera vez que se pone de manifiesto un posible papel del ácido lipoico en la reducción de ribonucleótidos. Anteriormente Fuchs *et al* (1983) habían construido un triple mutante *lipA<sup>-</sup>gshA<sup>-</sup>trxA<sup>-</sup>* pero éste no crecía en medio mínimo ni siquiera cuando se suplementaba con glutatión o ácido lipoico, sugiriendo la presencia de otras deficiencias metabólicas no caracterizadas.

### ***Actividad RDRasa y contenido en glutatión en las estirpes deficientes en glutatión y ácido lipoico***

La Tabla 22 muestra las determinaciones de RDRasa y glutatión de todas las estirpes cuya construcción se describe en el apartado III.3, incluyéndose como control los datos de las estirpes UC5710, UC844, UC848 y UC827 (Tabla 16, pág. 106).

La deficiencia en GSH incrementó 4,73 veces la actividad RDRasa, siendo este aumento superior al producido por la deficiencia en Trx (x 3,38) y especialmente por la deficiencia en glutarredoxina (x 1,61). No obstante, la deficiencia en GSH no tuvo efectos sinérgicos sobre la actividad RDRasa cuando se combinó con las deficiencias en Trx o Grx1. De hecho, los elevados niveles de actividad RDRasa de la estirpe *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* (x 23,46) disminuyeron más de un 50%

**Tabla 22. Actividad ribonucleótido reductasa y contenido en glutatión de estirpes deficientes en glutatión y/o ácido lipóico derivadas de UC5710<sup>a</sup>.**

Estirpe	Genotipo	RDRasa	Glutatión total
(UC5710)	<i>wt</i>	0,25 ± 0,10 (1,00)	8.478 ± 427 (1,00)
(UC858)	<i>gsh</i> <sup>-</sup>	1,17 ± 0,43 (4,73)	<0,1 (<0,00012)
(UC938)	<i>lip</i> <sup>-</sup>	0,38 ± 0,01 (1,56)	5.326 ± 158 (0,63)
(UC844)	<i>trx</i> <sup>-</sup>	0,83 ± 0,31 (3,38)	6.194 ± 155 (0,73)
(UC848)	<i>grx</i> <sup>-</sup>	0,40 ± 0,11 (1,61)	4.757 ± 242 (0,56)
(UC859)	<i>gsh</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup>	0,97 ± 0,48 (3,94)	<0,1 (<0,00012)
(UC952)	<i>gsh</i> <sup>-</sup> <i>grx</i> <sup>-</sup>	1,22 ± 0,17 (4,95)	<0,1 (<0,00012)
(UC939)	<i>lip</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup>	1,94 ± 0,09 (7,87)	3.667 ± 263 (0,43)
(UC941)	<i>lip</i> <sup>-</sup> <i>grx</i> <sup>-</sup>	0,84 ± 0,20 (3,34)	6.391 ± 117 (0,75)
(UC827)	<i>trx</i> <sup>-</sup> <i>grx</i> <sup>-</sup>	5,77 ± 0,47 (23,46)	5.936 ± 107 (0,70)
(UC956)	<i>gsh</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> <i>grx</i> <sup>-</sup>	2,48 ± 0,19 (10,08)	<0,1 (<0,00012)
(UC954)	<i>gsh</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> <i>lip</i> <sup>-</sup>	0,99 ± 0,04 (4,02)	<0,1 (<0,00012)

<sup>a</sup> La actividad RDRasa se expresa como nmoles dCDP/ 20 min x mg proteína, y el contenido en glutatión total como nmoles de glutatión/g peso seco. Entre paréntesis se indica la relación entre los valores de cada una de las estirpes y los de la estirpe parental UC5710.

en la estirpe *grx*<sup>-</sup> *gsh*<sup>-</sup> *trx*<sup>-</sup> (x 10,08). A diferencia de la mutación *gsh*<sup>-</sup>, la mutación *lip*<sup>-</sup> tuvo poco efecto, *per se*, sobre la actividad RDRasa (x 1,56), aunque mostró un efecto sinérgico cuando se combinó con la mutación *grx*<sup>-</sup> (x 3,34), pero sobre

todo con la *trx<sup>-</sup>* (x 7,87). De forma similar a lo observado en la estirpe *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>*, la introducción de la mutación *gsh<sup>-</sup>* en el doble mutante *lip<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* disminuyó en un 49% sus elevados niveles de actividad RDRasa (4,02 vs 7,87).

El mayor efecto de la deficiencia en GSH sobre la actividad RDRasa que la deficiencia en Grx1 podría atribuirse al hecho de que este tripéptido es donador de electrones de todas las glutarredoxinas conocidas. No obstante, dado que dicho efecto fue incluso superior al de la deficiencia en Trx, el GSH podría modular directamente la expresión de la RDRasa, además de su papel como donador de electrones de las glutarredoxinas. La ausencia de efecto sinérgico positivo de la mutación *gsh<sup>-</sup>* con la mutación *trx<sup>-</sup>* o las mutaciones *lip<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* se podría explicar teniendo en cuenta (Tabla 21, pág. 126): (i) los incrementos en actividad glutarredoxina de las estirpes *gsh<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* y *lip<sup>-</sup>gsh<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* y (ii) la posibilidad de que los niveles detectados de actividad RDRasa constituyesen sólo una pequeña fracción de los niveles de esta proteína, tal como ocurre con la Grx1. Además, habría que tener presente que algunas de las combinaciones de las mutaciones referidas podrían aumentar de forma notable los niveles de Grx3, explicando que la actividad RDRasa se incrementase menos de lo esperado, o incluso que bajase.

El contenido en GSH de las estirpes con la mutación *gshA* fue lógicamente siempre inferior al límite de detección del HPLC. Las restantes estirpes de la Tabla 20 mostraron en todos los casos niveles de GSH inferiores al tipo silvestre (entre 0,75 y 0,43 veces). Esto podría atribuirse a una menor eficiencia de la conversión de sulfato en cisteína vía PAPS reductasa, y consecuentemente en la biosíntesis de glutatión.

### III.4. ESTADO REDOX DEL GLUTATIÓN

El contenido en glutatión total no se vio afectado de forma significativa en ninguna de las estirpes aisladas en el presente trabajo, a excepción de los mutantes dobles *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* incapaces de crecer en cajas de medio mínimo (Tabla 16, pág.108). Por otra parte, tiorredoxina y glutarredoxina tienen actividad tioltransferasa y por tanto participan en el mantenimiento del estado redox de los tioles intracelulares (Mannervik *et al.*, 1983). La combinación de estos dos descubrimientos nos llevaron a analizar el estado redox intracelular del glutatión en dichas estirpes. El grado de oxidación del glutatión intracelular puede expresarse como la relación [GSSG]/[GSH] o también como la relación [P-SSG]/[GSH] que en *E. coli* se altera de modo paralelo a la primera (Alonso-Moraga *et al.*, 1987).

#### III.4.1. Estado redox del glutatión en las estirpes deficientes en tiorredoxina y/o glutarredoxina derivadas de UC1101 y K38.

UC1101 y los mutantes *grx<sup>-</sup>* y/o *trx<sup>-</sup>* derivados de ella presentaron, sorprendentemente, niveles indetectables de GSSG. Por ello, la Tabla 23 muestra los niveles de glutatión oxidado en forma de disulfuros mixtos proteína-glutatión. A pesar de su supuesto papel en el mantenimiento del estado redox del glutatión, la deficiencia en Trx o Grx1 apenas afectó al grado de oxidación de este metabolito, con la posible excepción de las estirpes carentes del plásmido pKM101. La relación [P-SSG]/[GSH] que indica el estado oxidado del glutatión sólo aumentó marcadamente en los dobles mutantes *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>\** (con bajos niveles de glutatión total), entre 2,47 y 3,58 veces superior a la de los correspondientes tipos silvestres. Sin embargo, en los dobles mutantes *grx<sup>-</sup>trx<sup>-</sup>* capaces de crecer en cajas de medio mínimo la relación [P-SSG]/[GSH] recuperó valores similares a los de las correspondientes estirpes parentales. La recuperación de la relación [P-SSG]/[GSH] en los dobles mutantes capaces de crecer en medio mínimo sugiere que estas estirpes poseen niveles normales de actividad tioltransferasa que podría corresponder al incremento en Grx3 previamente postulado (pág. 109).

Hasta la fecha el único trabajo donde se había descrito el estado redox del glutatión en estirpes de *E. coli* es el de Alonso-Moraga *et al.* (1987). Los datos mostrados en el presente trabajo están en el mismo orden de magnitud que los descritos por estos autores, aunque difieren de los suyos en los siguientes aspectos:

Tabla 23. Estado redox del glutatión en diversas estirpes de *E. coli*<sup>a</sup>.

Genotipo <sup>b</sup>	Derivadas de UC1101						Derivadas K38 (-pKM101)					
	+pKM101			-pKM101			[GSH]			[P-SSG]		
	[GSH]	[P-SSG]	[P-SSG]/[GSH]	[GSH]	[P-SSG]	[P-SSG]/[GSH]	[GSH]	[P-SSG]	[P-SSG]/[GSH]	[GSH]	[P-SSG]	[P-SSG]/[GSH]
<i>wt</i>	7.475 ± 402 (1,00)	137 ± 7 (1,00)	0,018 (1,00)	8.321 ± 425 (1,00)	157 ± 2 (1,00)	0,019 (1,00)	12.231 ± 424 (1,00)	253 ± 6 (1,00)	0,0207 (1,00)			
<i>trx<sup>-</sup></i>	5.382 ± 127 (0,72)	92 ± 5 (0,67)	0,017 (0,94)	6.056 ± 147 (0,73)	138 ± 5 (0,88)	0,023 (1,21)	15.142 ± 147 (1,24)	249 ± 7 (0,98)	0,0164 (0,79)			
<i>grx<sup>-</sup></i>	4.621 ± 109 (0,62)	94 ± 4 (0,69)	0,020 (1,11)	4.623 ± 239 (0,56)	134 ± 8 (0,85)	0,029 (1,53)	14.892 ± 546 (1,21)	282 ± 15 (1,11)	0,0189 (0,91)			
<i>grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup> *</i>	693 ± 95 (0,09)	41 ± 1 (0,30)	0,059 (3,28)	910 ± 195 (0,11)	43 ± 6 (0,27)	0,047 (2,47)	701 ± 213 (0,06)	52 ± 4 (0,21)	0,0742 (3,58)			
<i>grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup></i>	4.930 ± 361 (0,66)	82 ± 6 (0,60)	0,017 (0,94)	5.835 ± 112 (0,70)	101 ± 5 (0,64)	0,017 (0,89)	--	--	--			

<sup>a</sup> Los contenidos de las distintas formas de glutatión se expresan en nmol/g peso seco; el GSSG fue en todos los casos <0,1 nmol/g peso seco. Entre paréntesis se indica la relación entre los distintos valores de cada estirpe y los de la estirpe parental. El asterisco diferencia la estirpe *grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup>* incapaz de crecer en medio mínimo.

<sup>b</sup> El genotipo indicado se refiere a las estirpes que se indican a continuación. Derivadas de UC1101 sin plásmido pKM101: UC5710 (*wt*), UC844 (*trx<sup>-</sup>*), UC848 (*grx<sup>-</sup>*), UC946 (*grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup> \**) y UC827 (*grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup>*). Derivadas de K38: K38 (*wt*), A307 (*trx<sup>-</sup>*), A407 (*grx<sup>-</sup>*) y A410 (*grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup> \**)

(i) las estirpes silvestres usadas por Alonso-Moraga *et al.* presentaron unas 4 veces más glutatión total que las analizadas en este trabajo, y (ii) unas 1,6 veces mayor contenido en disulfuros mixtos proteína-SSG. Ambas circunstancias explicarían que estos autores fuesen capaces de detectar GSSG, aunque las diferencias también podrían ser atribuidas a los diferentes métodos de análisis empleados.

### III.4.2. Estado redox del glutatión en las estirpes sobreproductoras derivadas del tipo silvestre UC5710

Como se comentó en el apartado anterior, los mutantes simples *trx<sup>-</sup>* ó *grx<sup>-</sup>* no aportaron resultados concluyentes sobre el postulado papel de estas dos proteínas en el mantenimiento del estado redox intracelular del glutatión. Por ello se siguió una estrategia alternativa, analizándose los niveles de las diversas formas del glutatión en estirpes sobreproductoras de cada una de estas proteínas, incluyéndose la sobreproductora de RDRasa como control (Tabla 24).

Sorprendentemente, la estirpe parental portadora del vector de clonación pBR322, a pesar de mostrar niveles de glutatión total inferiores incluso a los de las estirpes silvestres de la Tabla 21, poseía niveles detectables de GSSG, aunque niveles de disulfuros mixtos P-SSG netamente inferiores a ellas. Por tanto, la Tabla 24 muestra no sólo la relación  $[P-SSG]/[GSH]$  sino también la  $[GSSG]/[GSH]$  como forma alternativa de expresar el grado de oxidación del glutatión. La tiorredoxina no parece desempeñar un papel muy importante en el grado de oxidación del glutatión, dado que la relación  $[GSSG]/[GSH]$  disminuyó sólo al 43% en la estirpe sobreproductora de Trx, aunque el contenido de esta proteína era 10,41 veces mayor que la de su correspondiente parental (Tabla 17, página 111). Por el contrario, la sobreproducción de glutarredoxina alteró drásticamente la relación  $[GSSG]/[GSH]$ . En efecto, la estirpe correspondiente mostró niveles indetectables de GSSG, por lo que su relación  $[GSSG]/[GSH]$  disminuyó a  $<0,001$  veces la de su estirpe parental. Conviene indicar que la sobreproducción de Trx ó Grx1 apenas alteró la relación  $[P-SSG]/[GSH]$ , mostrando variaciones similares a las observadas en la estirpe sobreproductora de RDRasa. El posible papel de la glutarredoxina en la reducción del GSSG está de acuerdo con lo descrito previamente por Mannervik *et al.* (1983) que habían demostrado el papel preponderante del sistema tioltransferasa (glutarredoxina) de hígado de rata en la reducción de disulfuros de bajo peso molecular.

Tabla 24. Efecto de la sobreproducción de Trx, Grx y RDRasa sobre el estado redox del glutatión del tipo silvestre UC5710<sup>a</sup>.

Genotipo	Proteína sobreproducida	Glutatión				
		[GSH]	[GSSG]	[GSSG]/[GSH]	[P-SSG]	[P-SSG]/[GSH]
UC5710 / pBR322	--	4.675 ± 285 (1,00)	28 ± 7 (1,00)	0,0060 (1,00)	64 ± 4 (1,00)	0,0137 (1,00)
UC5710 / pBHK8	Trx	3.128 ± 427 (0,67)	8 ± 2 (0,29)	0,0026 (0,43)	55 ± 4 (0,86)	0,0176 (1,28)
UC5710 / pBR322ECG	Grx	13.246 ± 213 (2,83)	<0,1 (<0,004)	0,000008 (<0,001)	223 ± 11 (3,48)	0,0168 (1,23)
UC5710 / pAL7	RDRasa	5.619 ± 125 (1,20)	53 ± 10 (1,89)	0,0094 (1,57)	93 ± 5 (1,45)	0,0166 (1,21)

<sup>a</sup> Los contenidos de las distintas formas de glutatión se expresan en nmol/g peso seco. Entre paréntesis se indica la relación entre los distintos valores de cada estirpe y los de la estirpe parental UC5710/pBR322.



Conviene resaltar que los estudios que se acaban de describir sobre el estado redox intracelular del glutatión muestran el estado de equilibrio en el que se encuentran las distintas formas del glutatión en estirpes crecidas en medio mínimo suplementado con casaminoácidos. En un futuro próximo se proyecta ampliar estos estudios en bacterias tratadas con diamida o dietil-maleato con el fin de determinar el papel de tiorredoxina y glutarredoxina sobre su capacidad de recuperación frente al estrés oxidativo.

### **III.4.3. Estado redox del glutatión en las estirpes deficientes en glutatión y/o ácido lipoico.**

Los datos se muestran en la Tabla 25 que incluye como control los resultados de las estirpes deficientes en tiorredoxina y/o glutarredoxina previamente descritos (Tabla 16, pág. 106).

La mutación *lip<sup>-</sup>* no alteró la relación [P-SSG]/[GSH] en comparación con la estirpe parental. Sólo en combinación con la deficiencia en Grx1 dicha mutación aumentó en 1,89 la relación [P-SSG]/[GSH]. Este resultado podría atribuirse a que la deficiencia en ácido lipoico impediría la posible participación de la Grx3 en la reducción de disulfuros mixtos proteína-glutatión.

**Tabla 25. Estado redox del glutatión en estirpes deficientes en glutatión y/o ácido lipoico derivadas de UC5710<sup>a</sup>.**

Estirpe	Genotipo	[GSH]	[P-SSG]	[P-SSG]/[GSH]
(UC5710)	<i>wt</i>	8.321 ± 425 (1,00)	157 ± 2 (1,00)	0,019 (1,00)
(UC858)	<i>gsh</i> <sup>-</sup>	<0,1 --	<0,1 --	-- --
(UC938)	<i>lip</i> <sup>-</sup>	5.212 ± 139 (0,63)	116 ± 15 (0,74)	0,022 (1,16)
(UC844)	<i>trx</i> <sup>-</sup>	6.056 ± 147 (0,73)	138 ± 5 (0,88)	0,023 (1,21)
(UC848)	<i>grx</i> <sup>-</sup>	4.623 ± 239 (0,56)	134 ± 8 (0,85)	0,029 (1,53)
(UC859)	<i>gsh</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup>	<0,1 --	<0,1 --	-- --
(UC952)	<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>gsh</i> <sup>-</sup>	<0,1 --	<0,1 --	-- --
(UC939)	<i>lip</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup>	3.617 ± 255 (0,43)	57 ± 6 (0,36)	0,016 (0,84)
(UC941)	<i>lip</i> <sup>-</sup> <i>grx</i> <sup>-</sup>	6.268 ± 162 (0,75)	131 ± 17 (0,83)	0,036 (1,89)
(UC827)	<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup>	5.835 ± 112 (0,70)	101 ± 5 (0,64)	0,017 (0,89)
(UC956)	<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>gsh</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup>	<0,1 --	<0,1 --	-- --
(UC954)	<i>lip</i> <sup>-</sup> <i>gsh</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup>	<0,1 --	<0,1 --	-- --

<sup>a</sup> Los contenidos de las distintas formas de glutatión se expresan en nmol/g peso seco; el GSSG fue en todos los casos <0,1 nmol/g peso seco. Entre paréntesis se indica la relación entre los distintos valores de cada estirpe y los de la estirpe parental UC5710.

### III.5. ACTIVIDAD TIORREDOXINA REDUCTASA Y GLUTATIÓN REDUCTASA

El presente trabajo demuestra la existencia de un control coordinado de los sistemas tiorredoxina y glutarredoxina en la reducción de la ribonucleótido reductasa, compensándose los niveles de actividad y contenido de proteínas de los distintos componentes del sistema. Para estudiar si este mismo control se extiende también a niveles anteriores en estas mismas rutas se determinaron las actividades tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa, que conectan el NADPH con la Trx o el GSH respectivamente. Los resultados obtenidos con las distintas estirpes construidas se muestran en las Tablas 26, 27 y 28.

En ninguna de las estirpes analizadas se apreciaron cambios importantes en las dos actividades enzimáticas estudiadas en relación a sus respectivos parentales. Estos resultados sugieren que el control a que se ven sometidas las dos rutas de reducción de ribonucleótidos se limita exclusivamente a los últimos pasos. Grandes expectativas se abren sobre la regulación de las nuevas glutarredoxinas descubiertas en el mutante UC647, Grx2 y Grx3 (Åslund *et al.*, 1994), sobre todo en su función como donadores de electrones para la RDRasa y PAPS reductasa. La obtención de mutaciones nulas en los genes que codifican estas dos nuevas glutarredoxinas y su efecto en el crecimiento bacteriano y síntesis de desoxirribonucleótidos abre un gran campo de posibles investigaciones.

Tabla 26. Actividad tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa en estirpes derivadas de UC1101<sup>a</sup>.

Genotipo	+ pKM101		- PKM101	
	TRasa	GRasa	TRasa	GRasa
<i>wt</i>	469 ± 26	139 ± 21	388 ± 29	126 ± 13
<i>trx</i> <sup>-</sup>	481 ± 44	132 ± 10	391 ± 39	130 ± 8
<i>grx</i> <sup>-</sup>	489 ± 50	128 ± 9	420 ± 17	149 ± 17
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup> *	637 ± 46	167 ± 25	374 ± 46	164 ± 17
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup>	563 ± 33	163 ± 19	415 ± 34	179 ± 11

<sup>a</sup> La actividad tiorredoxina reductasa se expresa como pmol S-S/20 min x mg proteína; la actividad glutatión reductasa se expresa como nmol NADPH oxidado/min x mg proteína. El asterisco diferencia la estirpe *grx*<sup>-</sup> *trx*<sup>-</sup> incapaz de crecer en medio mínimo.

Tabla 27. Actividad tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa en estirpes deficientes en glutatión y/o ácido lipoico derivadas de UC5710<sup>a</sup>.

Genotipo	TRasa	GRasa
<i>wt</i>	388 ± 29	126 ± 13
<i>gsh</i> <sup>-</sup>	372 ± 30	142 ± 24
<i>gsh</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup>	514 ± 43	172 ± 20
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>gsh</i> <sup>-</sup>	489 ± 42	120 ± 16
<i>lip</i> <sup>-</sup>	441 ± 32	142 ± 12
<i>lip</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup>	493 ± 26	128 ± 12
<i>lip</i> <sup>-</sup> <i>grx</i> <sup>-</sup>	554 ± 51	139 ± 15
<i>grx</i> <sup>-</sup> <i>gsh</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup>	488 ± 37	147 ± 9
<i>lip</i> <sup>-</sup> <i>gsh</i> <sup>-</sup> <i>trx</i> <sup>-</sup>	461 ± 52	133 ± 22

<sup>a</sup> La actividad tiorredoxina reductasa se expresa como pmol S-S/20 min x mg proteína; la actividad glutatión reductasa se expresa como nmol NADPH oxidado/min x mg proteína.

Tabla 28. Efecto de la sobreproducción de Trx, Grx y RDRasa sobre la actividad tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa del tipo silvestre UC5710 y del mutante doble UC827 (*grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup>*)<sup>a</sup>.

Plásmido sobreproductor	Proteína sobreproducida	<i>w<sup>t</sup></i>				<i>grx<sup>-</sup> trx<sup>-</sup></i>	
		TRasa	GRasa	TRasa	GRasa	TRasa	GRasa
pBR322	--	382 ± 21	144 ± 16	401 ± 35	130 ± 7		
pBHK8	Trx	375 ± 38	144 ± 12	470 ± 28	160 ± 13		
pBR322ECG	Grx	331 ± 42	139 ± 29	419 ± 39	137 ± 14		
pAL7	RDRasa	380 ± 26	146 ± 18	458 ± 16	125 ± 18		

<sup>a</sup> La actividad tiorredoxina reductasa se expresa como pmol S-S/20 min x mg proteína; la actividad glutatión reductasa se expresa como nmol NADPH oxidado/min x mg proteína.

#### ***IV. CONCLUSIONES***

- 1<sup>a</sup>. La tiorredoxina y glutaredoxina-1 no son esenciales para la reducción asimilatoria de sulfato y sus niveles están balanceados.
- 2<sup>a</sup>. La tiorredoxina muestra actividad glutaredoxina.
- 3<sup>a</sup>. Tiorredoxina y glutaredoxina-1 modulan los niveles y el estado redox del glutatión.
- 4<sup>a</sup>. El GSH modula el nivel de glutaredoxina-1.
- 5<sup>a</sup>. El ácido lipoico podría participar en la reducción de ribonucleótidos.
- 6<sup>a</sup>. La actividad ribonucleótido reductasa y sus donadores de electrones, tiorredoxina, glutaredoxina-1 y posiblemente glutaredoxina-3, parecen formar un complejo entramado regulador para garantizar la síntesis de los precursores de ADN.

174  
of  
ange.  
page.

174  
and  
anged and  
mon A  
Larson  
M. 1994  
of: redup-  
action of  
1238  
A  
A  
A

1994

## V. BIBLIOGRAFÍA



- Abril N (1988) Selección de mutantes *gsh<sup>-</sup>* y *kat<sup>-</sup>* de *Escherichia coli*. Respuesta a la acción letal y mutagénica de agentes tóxicos. Tesis Doctoral. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
- Abril N, Prieto MJ, Roncero MIG, Pueyo C (1989) Mutagenesis studies with catalase-and/or glutathion-deficient strains of *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 216: 270.
- Abril N, Pueyo C (1990) Mutagenesis in *E. coli* lacking catalase. *Environ. Mol. Mutagen.* 15: 184-189.
- Abril N, Roldán-Arjona T, Prieto-Alamo MJ, van Zeeland AA, Pueyo C (1992) Mutagenesis and DNA repair for alkylation damages in *Escherichia coli* K-12. *Environ. Mol. Mutagen.* 19: 288-296.
- Adler S, Modrich P (1983) T7-induced DNA polymerase requirement for thioredoxin sulfhydryl groups. *J. Biol. Chem.* 258: 6956-6962.
- Alonso-Moraga A, Bocanegra A, Torres JM, López-Barea J, Pueyo C (1987) Glutathione status and sensitivity to GSH-reacting compounds in *Escherichia coli* strains deficient in glutathione metabolism and/or catalase activity. *Mol. Cell. Biochem.* 72: 61-68.
- Amara FM, Chen FY, Wright JA (1994) Phorbol ester modulation of a novel cytoplasmic protein binding activity at the 3'-untranslated region of mammalian ribonucleotide reductase R2 mRNA and role in message stability. *J. Biol. Chem.* 269: 6709-6715.
- Apontoweil P, Berends W (1975) Glutathione biosynthesis in *Escherichia coli* K12. Properties of the enzymes and regulation. *Biochem. Biophys. Acta* 399: 1-9.
- Askelöf P, Axelsson K, Ericksson SA, Manervick B (1974) Mechanism of action of enzymes catalyzing thiol-disulfide interchange. Thioldtransferase rather than transhydrogenases. *FEBS Lett.* 38: 263-267.
- Augustin LB, Jacobson BA, Fuchs JA (1994) *Escherichia coli* Fis and DnaA proteins bind specifically to the *nrd* promoter region and affect expression of an *nrd-lac* fusion. *J. Bacteriol.* 176: 378-387.
- Åberg A, Hahne S, Karlsson M, Larsson Å, Örmö M, Åhlgren A, Sjöberg BM (1989) Evidence of two different classes of redox-active cysteines in ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264: 12249-12252.
- Åslund F, Ehn B, Miranda-Vizuet A, Pueyo C, Holmgren A (1994) Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: glutaredoxin-3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin / glutaredoxin-1 double mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9813-9817.
- Ball CA, Johnson RC (1991) Efficient excision of phage  $\lambda$  from the *Escherichia coli* chromosome requires the Fis protein. *J. Bacteriol.* 173: 4027-4031.
- Bayer ME, Bayer MH, Lunn CA, Pigiet VP (1987) Association of thioredoxin with the inner membrane and adhesion sites in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 2659-2666.
- Berglund O (1969) Identification of a thioredoxin induced by bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* 244: 6306-6308.
- Berglund O, Holmgren A (1975) Thioredoxin reductase-mediated hydrogen transfer from *Escherichia coli* thioredoxin-(SH)<sub>2</sub> to phage T4 thioredoxin-S<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 250: 2778-2782.
- Bianchi V, Reichard P, Eliasson R, Pontis
- Askelöf P, Axelsson K, Ericksson SA,

- E, Krook M, Jörnvall H, Haggård-Ljungquist E (1993a) *Escherichia coli* ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase: activation of *E. coli* anaerobic ribonucleotide reduction, cloning of the gene (fpr), and overexpression of the protein. *J. Bacteriol.* 175: 1590-1595.
- Bianchi V, Eliasson R, Fontecave M, Mulliez E, Hoover DM, Matthews RG, Reichard P (1993b) Flavodoxin is required for the activation of the anaerobic ribonucleotide reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 792-797.
- Björnberg O, Holmgren A (1991) Characterization of homogeneous recombinant glutaredoxin from *Escherichia coli*: purification from an inducible  $\lambda$ P<sub>L</sub> expression system and properties of a novel elongated form. *Protein Expression and Purification* 2: 287-295.
- Black S, Harte EM, Hudson B, Wartofsky L (1960) A specific enzymatic reduction of L-methionine sulfoxide and a related non specific reduction of disulfides. *J. Biol. Chem.* 235: 2910-2916.
- Blanco M (1976) En *Experiencias de Genética Microbiana*.. (Instituto de Investigaciones Citológicas, ed.), Valencia, vol. 6 pp. 17-93.
- Blombäck B, Blombäck M, Finkbeiner W, Holmgren A, Kowalska-Loth B, Olovson G (1974) Enzymatic reduction of disulfide bonds in fibrinogen by thioredoxin system I. Identification of reduced bonds and studies on reoxidation process. *Throm. Res.* 4: 55-75.
- Bolívar F, Rodríguez RL, Green PJ, Betlach MC, Heynecker HL, Boyer HW (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113.
- Bosch L, Nilsson L, Vijgenboom E, Verbeek H (1990) FIS-dependent trans-activation of tRNA and rRNA operons of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1050: 293-301.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bridges BA, Woodgate R (1985) Mutagenic repair in *Escherichia coli*: products of *recA* gene and of the *umuD* and *umuC* genes act at different steps in UV-induced mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 4193-4197.
- Brot N, Weissbach L, Werth J, Weissbach H (1981) Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2155-2158.
- Brown NC, Canellakis ZN, Lundin B, Reichard P, Thelander L (1969) Ribonucleoside diphosphate reductase. Purification of the two subunits, proteins B1 and B2. *Eur. J. Biochem.* 9: 561-573.
- Brown NC, Reichard P (1969a) Ribonucleoside diphosphate reductase. Formation of the active and inactive complexes of proteins B1 and B2. *J. Mol. Biol.* 46: 25-38.
- Brown NC, Reichard P (1969b) Role of effector binding in allosteric control of ribonucleoside diphosphate reductase. *J. Mol. Biol.* 46: 39-55.
- Buchanan BB (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 31: 341-374.
- Carlson J, Fuchs JA, Messing J (1984) Primary structure of the *Escherichia coli* ribonucleoside diphosphate reductase operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4292-4297.
- Chamberlin M (1974) Isolation and

characterization of prototrophic mutants of *Escherichia coli* unable to support the intracellular growth of T7. *J. Virol.* 14: 509-516.

Chan AK, Litchfield DW, Wright JA. Phosphorylation of ribonucleotide reductase R2 protein: *in vivo* and *in vitro* evidence of a role for p34<sup>cdc2</sup> and CDK2 protein kinases. *Biochemistry* 32: 12835-12840.

Chen FY, Amara FM, Wright JA (1993) Mammalian ribonucleotide eductase R1 mRNA stability under normal and phorbol ester stimulating conditions: involvement of a *cis-trans* interaction at the 3'-untranslated region. *EMBO J.* 12: 3977-3986.

Denhardt DT y Model P (1975) The single-stranded DNA phages. *Crit. Rev. Microbiol.* 4: 161-223.

Dunn JJ, Studier FW (1983) Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the localization of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.* 166: 477-535.

Dyson HJ, Wright PE, Holmgren A (1988) Structural differences between oxidized and reduced thioredoxin monitored by two-dimensional H-1-NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* 228: 254-258.

Dyson HJ, Holmgren A, Wright PE (1989) Assignment of the proton NMR spectrum of reduced and oxidized thioredoxin: sequence-specific assignments, secondary structure and global fold. *Biochemistry* 28: 7074-7087.

Dyson HJ, Gippert GP, Case DA, Holmgren A, Wright PE (1990) Three-dimensional solution of the reduced form of *Escherichia coli* thioredoxin determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 29: 4129-4136.

Echols H, Goodman MF (1990) Mutation induced by DNA damage: a many protein

affair. *Mutat. Res.* 236: 301-311.

Echols H, Goodman MF (1991) Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 477-511.

Edman JC, Ellis L, Blacher RW, Roth RA, Rutter WJ (1985) Sequence of protein disulfide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature* 317: 267-270.

Ejiri SI, Weissbach H, Brot N (1979) Reduction of methionine sulfoxide to methionine by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 139: 161-164.

Ejiri SI, Weissbach H, Brot N (1980) The purification of the methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 102: 393-398.

Eklund H, Cambillau C, Sjöberg BM, Holmgren A, Jörnvall H, Höög JO, Brändén CI (1984) Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO J.* 3: 1443-1449.

Eliasson R, Pontis E, Fontecave M, Gerez C, Harder J, Jörnvall H, Krook M, Reichard P (1992) Characterization of components of the anaerobic ribonucleotide reductase system from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267: 25541-25547.

Elledge SJ, Walker GC (1983) Proteins required for ultraviolet light and chemical mutagenesis: identification of the products of the *umuC* locus of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 164: 175-192.

Elledge SJ, Davis RW (1987) Identification and isolation of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: a DNA damage-inducible gene required for mitotic viability. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2783-2793.

Elledge SJ, Davis RW (1989) DNA damage

induction of ribonucleotide reductase. *Mol. Cell. Biol.* 9: 4932-4940.

Elledge SJ, Davis RW (1990) Two genes differentially regulated by DNA damage and the cell cycle encode alternate regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev.* 4: 740-751.

Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB (1992) Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *TIBS* 17: 119-123.

Englesberg E, Anderson RL, Weinberg R, Lee N, Hoffee P, Huttenhaver G, Boyer H (1962) L-arabinose-sensitive, L-ribulose-5-phosphate-4-epimerase deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 84: 137-146.

Englesberg E y Wilcox G (1974) Regulation: positive control. *Annu. Rev. Genet.* 8: 219-242.

Engström Y, Rozell B, Hansson HA, Stemme S, Thelander L (1984) Localization of ribonucleotide reductase in mammalian cells. *EMBO J.* 3: 863-867.

Engström Y, Francke U (1985) Assignment of the structural gene for subunit M1 of human ribonucleotide reductase to the short arm of chromosome 11. *Exp. Cell Res.* 158: 477-483.

Eriksson S, Martin DW Jr. (1981) Ribonucleotide reductase in cultured mouse lymphoma cells. Cell cycle dependent variation in the activity of subunit protein M2. *J. Biol. Chem.* 256: 9436-9440.

Eriksson S, Gräslund A, Skog S, Thelander L, Tribukait B (1984) Cell cycle dependent regulation of mammalian ribonucleotide reductase. The S-phase correlated increase in subunit M2 is regulated by *de novo* protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 259: 11695-11700.

Fahey RC, Brown WC, Adams WB,

Worsham MB (1978) Occurrence of glutathione in bacteria. *J. Bacteriol.* 133: 1126-1129.

Filpula D, Fuchs JA (1977) Regulation of ribonucleotide diphosphate reductase synthesis in *Escherichia coli*: increased enzyme synthesis as a result of inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Bacteriol.* 130: 107-113.

Fontecave M, Nordlund P, Eklund H, Reichard P (1992) The redox centers of ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. En *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (Meister A, ed.) John Wiley and sons Inc., New York, vol. 65, pp 147-183.

Fontecave M, Eliasson R, Reichard P (1989) Oxygen-sensitive ribonucleoside triphosphate reductase is present in anaerobic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2147-2151.

Freedman RB (1979) How many distinct enzymes are responsible for the several cellular processes involving thiol:protein-disulphide interchange? *FEBS Lett.* 97: 201-210.

Frei E, Bertran B, Wiessler M (1985) Reduced glutathione inhibits the alkylation by *N*-Nitrosodimethylamine of liver DNA *in vivo* and microsomal fraction *in vitro*. *Chem. Biol. Inter.* 55: 123-137.

Frey PA, Ikeda BH, Ramos Gavino G, Speckhard DC, Wong SS (1978) *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex. Site coupling in electron and acetyl group transfer pathway. *J. Biol. Chem.* 253: 7234-7241.

Fuchs JA, Warner HR (1975) Isolation of an *Escherichia coli* mutant deficient in glutathione synthesis. *J. Bacteriol.* 124: 140-148.

Fuchs JA (1977) Coordinate control of the synthesis of ribonucleoside diphosphate

reductase components in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 130: 957-959.

Fuchs JA, Carlson J (1981) The role of thioredoxin in methionine sulfoxide reductase in *Escherichia coli*. En *Thioredoxins: Structure and Function*. Colloq. Int. CNRS-NASA. (Gadal P, ed.) Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, pp. 111-118.

Fuchs JA, Haller B, Tuggle CK (1983) Mutants of *Escherichia coli* altered in glutathion metabolism. En *Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects*. (Larson A., Orrenius S., Holmgren A., Mannervik B eds.) Raven Press, New York, pp. 385-393.

Fuchs JA, Tuggle CK (1986) Regulation of the synthesis of ribonucleotide reductase in *Escherichia coli*. En *Thioredoxin and Glutaredoxin Systems: Structure and Function* (Holmgren A, Brändén CI, Jörnvall H, Sjöberg BM eds.) Raven Press, New York, pp 227-232.

Fuchs JA (1989) Glutaredoxin. En *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects* part B (Dolphin D, Poulson R & Avramovic O eds.) John Wiley & sons Inc., New York, pp. 551-570.

Fujiwara K, Okamura-Ikeda K, Motokawa Y (1986) Chicken liver H-protein, a component of the glycine cleavage system, amino acid sequence and identification of the N<sup>ε</sup>-lipoyllysine residue. *J. Biol. Chem.* 261: 8836-8841.

Fuller RS, Funnell BE, Kornberg A (1984) The *dnaA* protein complex with the *E. coli* chromosomal origin (*oriC*) and other sites. *Cell* 38: 889-900.

Gibert I, Calero S, Barbé J (1990) Measurement of *in vivo* expression of *nrdA* and *nrdB* genes of *Escherichia coli* by using *LacZ* gene fusions. *Mol. Gen. Genet.* 220: 400-408.

Gille H, Egan JB, Roth A, Messer W (1991) The FIS protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 19: 4167-4172.

Glatt H, Protic-Sabljic M, Oesch F (1983) Mutagenicity of glutathione and cysteine in the Ames test. *Science* 220: 961-963.

Gleason FK, Holmgren A (1988) Thioredoxin and related proteins procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 54: 271-298.

Gold L, Pribnow D, Schneider T, Shinedling S, Singer BS, Stormo G (1981) Translational initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 35: 365-403.

González-Porqué P, Baldesten A, Reichard P (1970a) Purification of a thioredoxin system from yeast. *J. Biol. Chem.* 245: 2363-2370.

González-Porqué P, Baldesten A, Reichard P (1970b) The involvement of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate. *J. Biol. Chem.* 245: 2371-2374.

Gouy M, Gautier C (1982) Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucl. Acids Res.* 10: 7055-7074.

Grippo JF, Tienrungraj W, Dahmer MK, Housley PR, Pratt WB (1983) Evidence that the endogenous heat-stable glucocorticoid receptor activating factor is thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 258: 13658-13664.

Grippo JF, Holmgren A, Pratt WB (1985) Proof that the endogenous heat-stable glucocorticoid receptor activating factor is thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 260: 93-97.

Haffter P, Bickle TA (1987) Purification and DNA-binding properties of Fis and Cin, two proteins required for the bacteriophage P1 site-specific recombination system, *cin*. *J. Mol. Biol.* 198: 579-587.

Hammel KE, Cornwell KL, Buchanan BB (1983) Ferredoxin/flavoprotein-linked pathway for the reduction of thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80: 3681-3685.

Hanahan D (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. En *DNA Cloning. A Practical Approach*. (Glover DM ed), IRL Press, Oxford, Washington DC, USA, pp. 36-39.

Hanke PD, Fuchs JA (1983a) Regulation of ribonucleoside diphosphate reductase mRNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 154: 1040-1045.

Hanke PD, Fuchs JA (1983b) Characterization of the mRNA coding for ribonucleoside diphosphate reductase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 156: 1192-1197.

Hanke PD, Fuchs JA (1984) Requirement of protein synthesis for the induction of ribonucleoside diphosphate reductase mRNA in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 193: 327-331.

Harder J (1993) Ribonucleotide reductases and their occurrence in microorganisms: A link to the RNA/DNA transition. *FEBS Microbiol. Rev.* 12: 273-292.

Hauser J, Levine AS, Ennis DG, Chumakov KM, Woodgate R (1992) The enhanced mutagenic potential of the MucAB proteins correlates with the highly efficient processing of the MucA protein. *J. Bacteriol.* 174: 6844-6851.

Herbert AA, Guest JR (1968) Biochemical and genetic studies with lysine+methionine mutants of *Escherichia coli*: lipoic acid and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase less mutants. *J. Gen. Microbiol.* 53: 363-381.

Herbert AA, Guest JR (1975) Lipoic acid content of *Escherichia coli* and other

microorganisms. *Arch. Microbiol.* 106: 259-266.

Hilson DA, Lambert N, Freedman RB (1984) Formation and isomerization of disulfide bonds in proteins: protein disulfide isomerase. *Methods Enzymol.* 107: 281-294

Holmgren A (1968) Thioredoxin 6. The amino acid sequence of the protein from *Escherichia coli* B. *Eur. J. Biochem.* 6: 475-484.

Holmgren A (1976) Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2275-2279.

Holmgren A, Morgan FJ (1976) Enzymatic reduction of disulfide bonds by thioredoxin. The reactivity of disulfide bonds in human choriogonadotropin and its subunits. *Eur. J. Biochem.* 70: 377-383.

Holmgren A (1977) Bovine thioredoxin system. *J. Biol. Chem.* 252: 4600-4606.

Holmgren A (1978) Glutathione-dependent enzyme reactions of the phage T4 ribonucleotide reductase system. *J. Biol. Chem.* 253: 7424-7430.

Holmgren A, Ohlsson I, Grankvist M-L (1978) Thioredoxin from *Escherichia coli*. Radioimmunological and enzymatic determinations in wild type cells and mutants in phage T7 DNA replication. *J. Biol. Chem.* 253: 430-436.

Holmgren A (1979a) Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. *J. Biol. Chem.* 254: 3672-3678.

Holmgren A (1979b) Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* 254: 9627-9632.

- Holmgren A (1979c) Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. *J. Biol. Chem.* 254: 9113-9119.
- Holmgren A (1979d) Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 254: 3664-3671.
- Holmgren A (1980) Pyridin nucleotide-disulfide oxidoreductases. En *Experientia Supplementum*. (Jeffery J. eds.) Basel, pp 149-180.
- Holmgren A (1983) The Glutaredoxin system. En *Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects*. (Larsson A, Orrenius S, Holmgren A y Mannervik B, eds.), Raven Press, New York, pp. 199-203.
- Holmgren A (1985) Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 237-271.
- Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin system. *J. Biol. Chem.* 264: 13963-13966.
- Hopper S, Iurlano D (1983) Properties of a thioredoxin purified from the rabbit bone marrow which fails to serve as a hydrogen donor for the homologous ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 258: 13453-13457.
- Höög JO, Jörnvall H, Holmgren A, Carlquist M, Persson M (1983) The primary structure of *Escherichia coli* glutaredoxin. Distant homology with thioredoxin in a superfamily of small proteins with a redox-active cystine disulfide/cysteine dithiol. *Eur. J. Biochem.* 136: 223-232.
- Höög JO, von Barh-Lindström H, Josephson S, Wallace B, Kushner SR, Jörnvall H, Holmgren A (1984) Nucleotide sequence of the thioredoxin gene from *Escherichia coli*. *Bioscience. Rep.* 4: 917-923.
- Höög JO, von Barh-Lindström H, Jörnvall H, Holmgren A (1986) Cloning and expression of the glutaredoxin (*grx*) gene of *Escherichia coli*. *Gene* 43: 13-21.
- Houk J, Whitesides GM (1987) Structure reactivity relations for thiol/disulfide interchange. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 6825-6836.
- Huber HE, Russel M, Model P, Richardson CC (1986) Interaction of mutant thioredoxins of *Escherichia coli* with the gene 5 protein of phage T7. *J. Biol. Chem.* 261: 15006-15012.
- Hurd HK, Roberts CV, Roberts JW (1987) Identification of the gene for the yeast ribonucleotide reductase small subunit and its inducibility by methyl methanesulfonate. *Mol. Cell. Biol.* 7: 3673-3677.
- Hurta RAR, Wright JA (1992) Alterations in the activity and regulation of mammalian ribonucleotide reductase by chlorambucil, a DNA damaging agent. *J. Biol. Chem.* 267: 7066-7071.
- Joseph PD, Carter MH, Goldberg MT (1985) Inhibition of benzidine mutagenesis by nucleophiles: a study using the Ames test with hamster hepatic S9 activation. *Mutat. Res.* 143: 5-10.
- Kato T, Shinoura Y (1977) Isolation and characterization of mutants of *E. coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light. *Mol. Gen. Genet.* 156: 121-131.
- Katti SK, LeMaster DM, Eklund H (1990) Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 212: 167-184.
- Kemeny DM (1991) En *A Practical Guide to ELISA*. Pergamon Press, Oxford, UK. pp.



25-26.

Kerklaan P, Bouter S, Mohn G (1983) Isolation of a mutant of *Salmonella typhimurium* strain TA1535 with decreased levels of glutathione (GH<sup>57</sup>). Primary characterization and chemical mutagenesis studies. *Mutat. Res.* 122: 257-266.

Kerklaan P, Zoetemelk CEM, Mohn G (1985) Mutagenic activity of various chemicals in *Salmonella* strain TA100 and glutathione-deficient derivatives on the role of glutathione in the detoxification or activation of mutagens inside bacterial cells. *Biochem. Pharmacol.* 34: 2151-2156.

Konigsberg W, Godson GN (1983) Evidence for use of rare codons in the *dnaG* gene and other regulatory genes of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 687-691.

Kredich, NM (1987) Biosynthesis of cysteine. En *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology*. (Neidhardt FC, ed.) Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., vol. 1, pp. 419-428.

Kreil G (1981) Transfer of proteins across the membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 317-348.

Kren B, Parsell D, Fuchs JA (1988) Isolation and characterization of an *Escherichia coli* K-12 mutant deficient in glutaredoxin. *J. Bacteriol.* 170: 308-315.

Kunz BA, Kohalmi SE (1991) Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels. *Annu. Rev. Genet.* 25: 339-359.

Langer PJ, Sahnabruch WG, Walker GC (1981) Functional organisation of plasmid pKM101. *J. Bacteriol.* 145: 1310-1316.

Larsson A, Sjöberg BM (1986) Identification of the stable free radical tyrosine residue in ribonucleotide reductase. *EMBO J.* 5:

2037-2040.

Laurent TC, Moore EC, Reichard P (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 239: 3436-3444.

Lawley PD, Thatcher CJ (1970) Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Biochem. J.* 116: 693-707.

LeMaster D, Richards FM (1988) NMR sequential assignment of *Escherichia coli* thioredoxin utilizing random fractional deuteration. *Biochemistry* 27: 142-150.

Lim CJ, Geraghty D, Fuchs JA (1985) Cloning and nucleotide sequence of the *trxA* gene of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 163: 311-316.

Lin AI, Ashley GW, Stubbe J (1987) Localization of the redox active thiols of ribonucleotide reductase. Sequence similarity between the *Escherichia coli* and *Lactobacillus leichmanii* enzymes. *Biochemistry* 26: 6905-6909.

Lunn CA, Pigiet VP (1982) Localization of thioredoxin from *Escherichia coli* in an osmotically sensitive compartment. *J. Biol. Chem.* 257: 1424-1430.

Lynch JB, Juárez-García C, Münck E, Que L Jr. (1989) Mossbauer and EPR studies of the binuclear iron center in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. A new iron-to-protein stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 264: 8091-8096.

Mann GJ, Dyne M, Musgrove EA (1987) Immunofluorescent quantification of ribonucleotide reductase M1 subunit and correlation with DNA content by flow cytometry. *Cytometry* 8: 509-517.



- Mannervik B, Axelsson K, Sundewall AG, Holmgren A (1983) Relative contributions of thioltransferase- and thioredoxin-dependent systems in reduction of low-molecular-mass and protein disulphides. *Biochem. J.* 213: 519-523.
- Mao SS, Johnston MI, Bollinger JM, Stubbe J (1989) Mechanism based inhibition of a mutant *Escherichia coli* ribonucleotide reductase (Cysteine-225→Serine) by its substrate CDP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1485-1489.
- Mao SS, Holler TP, Yu GX, Bollinger JM Jr., Booker S, Johnston MI, Stubbe J (1992a) A model for the role of multiple cysteine residues involved in ribonucleotide reduction: Amazing and still confusing. *Biochemistry* 31: 9733-9743.
- Mao SS, Holler TP, Bollinger JM Jr., Yu GX, Johnston MI, Stubbe J (1992b) Interaction of C225SR1 mutant subunit of ribonucleotide reductase with R2 and nucleoside diphosphates: Tales of a suicidal enzyme. *Biochemistry* 31: 9744-9751.
- Mao SS, Yu GX, Chalfoun D, Stubbe J (1992c) Characterization of C439SR1, a mutant of *Escherichia coli* ribonucleotide diphosphate reductase: Evidence that C439 is a residue essential for nucleotide reduction and C439SR1 is a protein possessing novel thioredoxin-like activity. *Biochemistry* 31: 9752-9759.
- Maron DM, Ames BN (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenesis test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.
- Mark DF, Richardson CC (1976) *Escherichia coli* thioredoxin: a subunit of bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 780-784.
- Martínez-Galisteo E, Padilla CA, Holmgren A, Bárcena JA (1994) Characterization of mammalian thioredoxin reductase, thioredoxin and glutaredoxin by immunochemical methods. *Comp. Biochem. Physiol.*, en prensa.
- Mata AM, Pinto MC, López-Barea J (1985) Redox interconversion of *Escherichia coli* glutathione reductase. A study with permeabilized and intact cells. *Mol. Cell. Biochem.* 68: 121-130.
- Matsumoto Y, Shigesada K, Hirano M, Imai M (1986) Autogenous regulation of the gene for transcription termination factor Rho in *Escherichia coli*: localization and function of its attenuators. *J. Bacteriol.* 166: 945-958.
- McFarlan SC, Terrell CA, Hogenkamp HPC (1992) The purification, characterization, and primary structure of a small redox protein from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, an archaebacterium. *J. Biol. Chem.* 267: 10561-10569.
- Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 711-760.
- Meng M, Hogenkamp, HPC (1981) Purification, characterization and amino acid sequence of thioredoxin from *Corynebacterium nephridii*. *J. Biol. Chem.* 256: 9174-9182.
- Modrich P, Richardson CC (1975) Bacteriophage T7 deoxyribonucleic acid replication "in vitro". A protein of *E. coli* required for bacteriophage T7 polymerase. *J. Biol. Chem.* 250: 5508-5514.
- Modrich P, Richardson CC (1975) Bacteriophage T7 deoxyribonucleic acid replication in vitro. *J. Biol. Chem.* 250: 5515-5522.
- Mohn G, Kniff P, Baars A (1983) Cellular glutathione content and sensitivity to alkyl-nitrosoguanidine-induced lethality and mutagenesis in *Escherichia coli* K-12. *Mutat. Res.* 111: 25-31.

- Mortelmans K, Stocker BAD (1979) Segregation of the mutator property of plasmid R46 from its ultraviolet-protecting property. *Mol. Gen. Genet.* 167: 317-328.
- Moore EC, Reichard P, Thelander L (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. V. Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 239: 3445-3452.
- Motokawa Y, Kikuchi G (1969) Glycine metabolism by rat liver mitochondria. IV. Isolation and characterization of hydrogen carrier protein, an essential factor for glycine metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 135: 402-409.
- Mulliez E, Fontecave M, Gaillard J, Reichard P (1993) An iron-sulfur center and a free radical in the active anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268: 2296-2299.
- Newton GL, Fahey RC (1990) Glutathione in prokaryotes. En *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. (Viña ed.) CRC Press, Boca Raton, pp. 69-77.
- Nilsson O, Åberg A, Lundquist T, Sjöberg BM (1988a) Nucleotide sequence of the gene coding for the large subunit of ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* 16: 4174-4175.
- Nilsson O, Lundquist T, Hahne S, Sjöberg BM (1988b) Structure-function studies of the large subunit of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* 16: 91-94.
- Nimmo (1987) The tricarboxylic acid cycle and anaplerotic reactions. En *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. (Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M y Umberger HE, eds.) Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., vol. 1, pp. 156-169.
- Norlund P, Sjöberg BM, Eklund H (1990) Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase. *Nature* 345: 593-598.
- Nygren H, Rozell B, Holmgren A, Hansson H-A (1981) Immunoelectron microscopic localization of glutaredoxin and thioredoxin in *Escherichia coli* cells. *FEBS Lett.* 1233: 145-150.
- Ondarza RN (1989) Enzyme regulation by biological disulfides. *Bioscience Rep.* 9: 5-18.
- Petersson L, Gräslund A, Ehrenberg A, Sjöberg BM, Reichard P (1980) The iron center in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 255: 6706-6712.
- Pueyo C (1978) Forward mutations to L-arabinose-resistance test with *Salmonella typhimurium*. A sensitive assay for mutagenicity testing. *Mutat. Res.* 54: 311-321.
- Pueyo C, López-Barea J (1979) The L-arabinose-resistance test with *Salmonella typhimurium* strain SV3 selects forward mutations at several genes. *Mutat. Res.* 64: 249-258.
- Pueyo C, Ruiz-Rubio M (1984) The L-arabinose resistance test with *Salmonella typhimurium*. En *Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection*. (de Serres FJ, ed.), Plenum Press, New York, vol. 9, pp. 89-109.
- Reed LJ, Hackert ML (1990) Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *J. Biol. Chem.* 265: 8971-8974.
- Reichard P (1962) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. I. Formation of deoxycytidine diphosphate from cytidine diphosphate with enzymes from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 237: 3513-3519.

- Reichard P (1987) Regulation of deoxy-ribonucleotide synthesis. *Biochemistry* 26: 3245-3248.
- Reichard P (1988) Interaction between deoxy-ribonucleotide and DNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 349-374.
- Reichard P (1993) From RNA to DNA. Why so many ribonucleotide reductases? *Science* 260: 1773-1777.
- Reutimann H, Straub B, Luisi PL, Holmgren A (1981) A conformational study of thioredoxin and its tryptic fragments. *J. Biol. Chem.* 256: 6796-6803.
- Robinson JR, Klein SM, Sagers RD (1973) Glycine metabolism. Lipoic acid as the prosthetic group in the electron transfer protein P<sub>2</sub> from *Peptococcus glycinophilus*. *J. Biol. Chem.* 248: 5319-5323.
- Rodríguez-Ariza A, Toribio F, López-Barea J (1994) Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 656: 311-318.
- Ross D, Moldens P, Sies H, Smith MT (1986) Mechanism and relevance of glutathione mutagenesis. *Mutat. Res.* 175: 127-131.
- Rozell B, Bárcena JA, Martínez-Galisteo E, Padilla CA, Holmgren A (1993) Immunochemical characterization and tissue distribution of glutaredoxin (thioltransferase) from calf. *Eur. J. Cell. Biol.* 62: 314-322.
- Ruiz-Rubio M, Hera C, Pueyo C (1984) Comparison of a forward and reverse mutation assay in *Salmonella typhimurium* measuring L-arabinose resistance and histidine prototrophy. *EMBO J.* 6: 1435-1440.
- Ruiz-Vázquez R, Pueyo C, Cerdá-Olmedo E (1978) A mutagen assay detecting forward mutations in an arabinose sensitive strain of *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 54: 121-129.
- Russel M, Model P (1984) Replacement of the *fip* gene of *Escherichia coli* by an inactive gene cloned on a plasmid. *J. Bacteriol.* 159: 1034-1039.
- Russel M, Model P (1985a) Thioredoxin is required for filamentous phage assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 29-33.
- Russel M, Model P (1985b) Direct cloning of the *trxB* gene that encodes thioredoxin reductase. *J. Bacteriol.* 163: 238-242.
- Russel M, Model P (1986) The role of thioredoxin in filamentous phage assembly. Construction, isolation and characterization of mutant thioredoxins. *J. Biol. Chem.* 261: 14997-15005.
- Russel M, Holmgren A (1988) Construction and characterization of glutaredoxin-negative mutants of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 990-994.
- Russel M, Model P, Holmgren A (1990) Thioredoxin or glutaredoxin in *Escherichia coli* is essential for sulfate reduction but not for deoxyribonucleotide synthesis. *J. Bacteriol.* 172: 1923-1929.
- Salz HK, Flickinger TW, Mittendorf E, Pellicena-Palle A, Petschek JP, Albrecht EB (1994) The drosophila maternal effect locus *deadhead* encodes a thioredoxin homolog required for female meiosis and early embryonic development. *Genetics* 136: 1075-1086.
- Savidge G, Carlebjörk G, Thorell L, Hessel B, Holmgren A, Blombäck B (1979) Reduction of factor VIII and other coagulation factors by the thioredoxin system. *Thrombosis Res.* 16: 587-599.
- Sandberg VA, Kren B, Fuchs JA, Woodward C (1991) *Escherichia coli*

glutaredoxin: Cloning and overexpression, thermodynamic stability of the oxidized and reduced forms and report of an N-terminal extended species. *Biochemistry* 30: 5475-5484.

Schlich F, Schimpff-Weiland G, Follmann H (1985) Methanogenic bacteria contain thioredoxin. *Naturwissenschaften* 72: 328-329.

Schriek U, Schwenn JD (1986) Properties of the purified APS-kinase from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 145: 32-38.

Schürmann P, Maeda K, Tsugita A (1981) Isomers in thioredoxins of spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 116: 37-45.

Sedgwick B, Robins P (1980) Isolation of mutants of *E. coli* with increased resistance to alkylating agents. Mutants deficient in thiols and mutants constitutive for the adaptative response. *Mol. Gen. Genet.* 180: 85-90.

Shaw W, Smith J, Spierto FW, Agnese ST (1977) Linearization of data for saturation-type competitive protein-protein binding assay and radioimmunoassay. *Clin. Chim. Acta* 76: 15-21.

Silberstein DS, Ali MH, Baker SL, David JR (1989) Human eosinophil cytotoxicity factor: purification, physical characteristics and partial amino acid sequence of an active polipeptide. *J. Immunol.* 143: 979-987.

Sjöberg BM, Holmgren A (1972) Studies on the structure of T4 thioredoxin. Amino acid sequence of the protein and comparison with thioredoxin of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 247: 8063-8068.

Sjöberg BM, Reichard P, Gräslund A, Ehrenberg A (1977) Studies on the structure of T4 thioredoxin. II. Amino acid sequence of the protein and comparison with thioredoxin from

*E. coli*. *J. Biol. Chem.* 252: 536-541.

Sjöberg BM, Reichard P, Gräslund A, Ehrenberg A (1978) The tyrosine free radical in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 253: 6863-6865.

Sjöberg BM, Eklund H, Fuchs JA, Carlson J, Standart NM, Ruderman JV, Bray SJ, Hunt T (1985) Identification of the stable free-radical tyrosine residue in ribonucleotide reductase: A sequence comparison. *FEBS Lett.* 183: 99-102.

Sodano P, Xia TH, Bushweller JH, Björnberg O, Holmgren A, Billeter M, Wüthrich K (1991a) Sequence-specific H-n.m.r. assignments and determination of the three-dimensional structure of reduced *Escherichia coli* glutaredoxin. *J. Mol. Biol.* 221: 1311-1324.

Sodano P, Chary KVR, Björnberg O, Holmgren A, Kren B, Fuchs JA, Wüthrich K (1991b) Nuclear magnetic resonance studies of recombinant *E. coli* glutaredoxin: sequence-specific assignment and secondary structure determination for the oxidized form. *Eur. J. Biochem.* 200: 369-377.

Söderberg BO, Sjöberg BM, Sonnerstam U, Brändén CI (1978) Three-dimensional structure of thioredoxin induced by bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5827-5830.

Steinborn G (1978) *Uvm* mutants of *Escherichia coli* K12 deficient in UV mutagenesis. I. Isolation of *uvm* mutants and their phenotypical characterization in DNA repair and mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.* 165: 87-93.

Stubbe J (1989) Protein radical involvement in biological catalysis? *Annu. Rev. Biochem.* 58: 257-285.

Stubbe J (1990) Ribonucleotide reductases:

amazing and confusing. *J. Biol. Chem.* 265: 5329-5332.

Sun L, Fuchs JA (1992) *Escherichia coli* ribonucleotide reductase expression is cell cycle regulated. *Mol. Biol. Cell* 3: 1095-1105.

Sun L, Jacobson BA, Dien BS, Srien F, Fuchs JA (1994) Cell cycle regulation of the *Escherichia coli* *nrd* operon: requirement for a *cis*-acting upstream AT-rich sequence. *J. Bacteriol.* 176: 2415-2426.

un X, Harder J, Krook M, Jörnvall H, Sjöberg B-M, Reichard P (1993) A possible glycine radical in anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*: Nucleotide sequence of the cloned *nrdD* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 577-581.

Tagaya Y, MaedaY, Mitsui A, Kondo N, Matsui H, Hamuro J, Brown N, Arai KI, Yokota T, Wakasugi H, Yodoi J (1989) ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/*Tac* inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *EMBO J.* 8: 757-764.

Thelander L (1973) Physicochemical characterization of ribonucleoside diphosphate reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 248: 4591-4601.

Thelander L (1974) Reaction mechanism of ribonucleoside diphosphate reductase *Escherichia coli*: oxidation-reduction-active disulfide in the B1 subunit. *J. Biol. Chem.* 249: 4858-4862.

Thelander L, Reichard P (1979) Reduction of ribonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 133-158.

Tsang MLS, Schiff JA (1976) Sulfate reducing pathway in *Escherichia coli* involving bound intermediates. *J. Bacteriol.* 125: 923-933.

Tsang MLS (1981) Assimilatory sulfate reduction in *Escherichia coli*: identification of the alternate cofactor for adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate reductase as glutaredoxin. *J. Bacteriol.* 146: 1059-1066.

Tsugita A, Maeda K, Schürmann P (1983) Spinach chloroplast thioredoxins in evolutionary drift. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115: 1-7.

Tuggle CK, Fuchs JA (1985) Glutathione reductase is not required for maintenance of reduced glutathione in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 162: 448-450.

Vanden Boom TJ, Reed KE, Cronan JE Jr. (1992) Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: Isolation of null mutants defective in lipoic acid biosynthesis, molecular cloning and characterization of the *E. coli* *lip* locus, and identification of the lipoylated protein of the glycine cleavage system. *J. Bacteriol.* 173: 6411-6420.

Viña J, Sáez GT, Wiggins D, Roberts AFC, Hems R, Krebs HA (1983) The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 212: 39-44.

von Döbeln U, Reichard P (1976) Binding of substrates to *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 251: 3616-3622.

Vogel HJ, Bonner DM (1956) Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 218: 97-106.

Walker GC (1978) Isolation and characterization of mutants of the plasmid pKM101 deficient in their ability to enhance mutagenesis and repair. *J. Bacteriol.* 133: 1203-1211.

Walker GC, Dobson PP (1979) Mutagenesis and repair deficiencies of *E. coli* *umuC* mutants are suppressed by the plasmid

pKM101. *Mol. Gen. Genet.* 172: 17-24.

Walker GC (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48: 68-93.

Wallace BJ, Kushner SR (1984) Genetic and physical analysis of thioredoxin (*trxA*) gene of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 32: 399-408.

Wells WW, Yang Y, Deits TL, Gan ZR (1993) Thioltransferases. *Adv. Enzymol.* 66: 149-201.

Wilson LG, Asahi T, Bandurski R (1961) Yeast sulfate reducing system I. Reduction of sulfate to sulfite. *J. Biol. Chem.* 236: 1822-1829.

Witkin EM (1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 40: 869-907.

Woodgate R, Rajalopalan M, Lu C, Echols H (1989) UmuC mutagenesis protein of *Escherichia coli*: purification and interaction with UmuD and umuD'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7301-7305.

Yang-Feng TL, Barton DE, Thelander L, Lewis WH, Srinivasan PR, Francke U (1987) Ribonucleotide reductase M2 subunit sequences mapped to four different chromosomal sites in humans and mice: Functional locus identified by its amplification in hydroxyurea-resistant cell lines. *Genomics* 1: 77-86.

Zlieger DM (1985) Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiol-disulfides in metabolic regulation. *Annu. Rev. Biochem* 54: 305-330.